(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-528109
(P2005-528109A)
(43)公表日　平成17年9月22日(2005.9.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	2G001
C07K 1/22	C07K	1/22		4B024
C12N 9/02	C12N	9/02		4B050
G01N 23/20	G01N	23/20		4B065
// C12N 1/15	C12N	5/00	A	4H045

審査請求 有　予備審査請求 有　（全 46 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-510429 (P2004-510429)
(86)(22)出願日　平成14年5月30日 (2002.5.30)
(85)翻訳文提出日　平成16年12月13日 (2004.12.13)
(86)国際出願番号　PCT/GB2002/002668
(87)国際公開番号　WO2003/102192
(87)国際公開日　平成15年12月11日 (2003.12.11)
(81)指定国　AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71)出願人　504162110
アステックス　テクノロジー　リミテッド
イギリス国　シービー4　0キューエイ　ケンブリッジシャー，ケンブリッジ，ミルトン　ロード，ケンブリッジ　サイエンス　パーク　４３６
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節

最終頁に続く

(54)【発明の名称】シトクロムＰ４５０タンパク質の精製法および結晶化法

(57)【要約】
本発明は、シトクロムP450分子の精製法を提供し、この方法は、シトクロムP450分子を宿主細胞培養物において発現させること；前記培養物から前記細胞を回収して高塩濃度バッファー中に前記細胞を懸濁すること；前記細胞を溶解して細胞片を除去し、高塩濃度溶解液を得ること；前記溶解液に界面活性剤を添加して高塩濃度-界面活性剤溶解液を得ること；ならびに前記溶解液から前記P450を回収することを含んでなる。本方法は結晶化に適したP450タンパク質の収量を与える。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
シトクロムP450を精製する方法であって、以下のステップ：
(a) 宿主細胞培養物においてシトクロムP450分子を発現させること；
(b) 前記培養物から前記細胞を回収し、12～110 mS/cmの電気伝導度を有する塩バッファーに前記細胞を懸濁すること；
(c) 前記細胞を溶解し、細胞片を除去して高塩濃度溶解液を得ること；
(d) 前記溶解液に界面活性剤を添加して高塩濃度-界面活性剤溶解液を得ること；および
(e) 前記溶解液から前記P450を回収すること；
を含んでなるが、ただし、前記塩バッファーが200～1000mMの濃度を有する場合、P450は220位がプロリンで置換されたヒト2C9 P450ではない、前記方法。
【請求項２】
前記塩バッファーが200～1000mMの塩濃度を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
界面活性剤が0.015～1.2% v/vの濃度で添加される、請求項1または２に記載の方法。
【請求項４】
ステップ(e)が、
(e(i)) 前記P450をアフィニティ担体に結合させること；
(e(ii)) 前記担体を高塩濃度-界面活性剤洗浄液中で洗浄すること；
(e(iii)) 高塩濃度-界面活性剤バッファー中に前記P450を取り出し、P450-高塩濃度-界面活性剤調製物を得ること；および
(f) 前記調製物を迅速に脱塩してP450-低塩濃度調製物を取得すること；
によって実施される、請求項１～３のうちいずれか１つに記載の方法。
【請求項５】
ステップ(f)が、サイズ排除クロマトグラフィーにより前記調製物から塩を除去することによって行われる、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
P450がポリヒスチジンタグを保有する、請求項１～５のいずれか１つに記載の方法。
【請求項７】
P450がCYP1、2、3または4ファミリーのメンバーである、請求項１～６のいずれか１つに記載の方法。
【請求項８】
P450がCYP2ファミリーのメンバーである、請求項7に記載の方法。
【請求項９】
P450が2C9または2C19である、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
P450がそのN末端の膜挿入要素に欠失を含んでなる、請求項１～９のいずれか１つに記載の方法。
【請求項１１】
前記P450のN末端配列が、N末端膜挿入要素の代わりに、配列MAKKTSSKGRまたはMAYGTHSHGLFKKを含んでなる、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記P450が配列番号2、4、6または8を有する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
P450の結晶化をさらに含んでなる、請求項１～１２のいずれか１つに記載の方法。
【請求項１４】
シトクロムP450の結晶。
【請求項１５】
前記P450が2C19であって、前記結晶が格子サイズa=158Å、b=158Å、c=212Å（a、bおよびcについて+/-5%）、α=90°、β=90°、γ=120°、および空間群P321を有する、請

求項１４に記載の結晶。
【請求項１６】
前記P450が2D6である、請求項１４に記載の結晶。
【請求項１７】
前記P450が、空間群I222および単位格子サイズa=77Å、b=99Å、c=129Å（a、bおよびcについて+/-5%）、β=90°を有する；または空間群C2および単位格子サイズa=152Å、b=101Å、c=78Å（a、bおよびcについて+/-5%）、α=90°、β=120°、γ=90°を有する3A4である、請求項１４に記載の結晶。
【請求項１８】
請求項１３に記載の方法にしたがって結晶を調製すること、その結晶をx線回折に供すること、および得られた回折パターンを解析して前記P450の原子の3次元座標を決定することを含んでなる、シトクロムP450の結晶構造を決定する方法。
【請求項１９】
配列番号５の2D6のコード配列を有するシトクロムP450 2D6を発現させるための核酸。
【請求項２０】
請求項１９に記載の核酸を含んでなる細菌発現ベクター。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明はシトクロムP450分子を特に結晶化に適した形に調製する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
シトクロムP450は、微生物、植物および動物の多くの種において生理学的に重要な化合物を代謝するヘムタンパク質の、非常に大きく複雑な遺伝子スーパーファミリーである。シトクロムP450は、ステロイド、胆汁、脂肪酸、プロスタグランジン、ロイコトリエン、レチノイドおよび脂質といった多岐にわたる内在性化合物の酸化的、過酸化的ならびに還元的代謝において重要である。上記酵素の多くはまた、薬物、環境化合物および汚染物質を含めた広範な生体異物も代謝する。
【０００３】
哺乳類シトクロムP450は、ミトコンドリア内膜（I型）または細胞の小胞体ネットワーク（II型）のいずれかに見出される50～55 kDaのヘム-チオラート酵素である。II型すなわちミクロソーム酵素は、N末端の膜貫通α-ヘリックスによって膜にしっかりと固定された内在性膜タンパク質である。この酵素の大部分は、細胞内腔ではなく脂質二重膜の細胞質側に面している。活性のために、シトクロムP450はフラビンタンパク質NADPH-シトクロムP450オキシドレダクターゼおよび、場合によっては、シトクロムb5を含めた他の膜酵素成分を必要とする。ある１つのシトクロムP450オキシドレダクターゼは、P450と直接相互作用して、必要とされる2電子をNADPHから転移することによって、すべての哺乳類ミクロソーム酵素の活性を補助する。シトクロムb5はある種のP450アイソフォームおよび特定の基質に対して電子伝達を高めるために必要である。シトクロムP450は、O_2分子の2つの酸素原子のうち1つを多様な基質に取り込むことができるが、同時にもう1つの酸素原子を2つの電子によってH_2Oに還元する。シトクロムP450は、ヒドロキシル化、エポキシ化、N-、S-、およびO-脱アルキル、N-酸化、スルホキシド化、脱ハロゲン、および他の反応を触媒することが知られている。
【０００４】
P450スーパーファミリーの遺伝子はNelsonら（Pharmacogenetics, 6;1-42, 1996）によ

って分類され、その開示内容は参考として本明細書に含めるものとするが、ここでNelsonはこのファミリーを構成する遺伝子の体系的な命名法を提案した。この命名法は、当技術分野で広く使用され、本明細書でも採用されている（”CYP”の接頭語は、サブファミリーグループを指す場合には省略される）。Nelsonらは、P450配列に関するデータベースシークエンスエントリーへの相互参照を提供する。

【０００５】

ホモ・サピエンスは、配列決定されたアイソフォームが総計で50を超える、17のシトクロムP450遺伝子ファミリーおよび42のサブファミリーを有する。ファミリー1、2および3のシトクロムP450は薬物代謝の主要経路を構成する。多くの薬物は、循環系からのクリアランスのために、および薬理学的な不活化のために、シトクロムP450による肝代謝に依存する。逆に言えば、一部の薬物はP450によって薬理学的に活性のある代謝物に体内で変換されるに違いない。既知のすべての薬物の50％がP450によって修飾され、多くの見込みのあるリード化合物がシトクロムP450との相互作用のために開発段階で中止されると推定される。薬の発見においてもっとも重大な問題の１つは、薬物リード物質の代謝および修飾に関するシトクロムP450の役割を予測することである。一連のリード化合物に関わる代謝上の問題を早期に検出することは、製薬業にとって最重要事項である。主要なヒト薬物代謝シトクロムP450の結晶構造を得ることは、P450酵素がどのように薬物分子を認識するかについて、および薬物結合の様式について、詳細な情報を提供するので、ドラッグデザインのためにきわめて有益であると思われる。このことは言い換えると、製薬会社が、代謝クリアランスを改善し、開発中の化合物の損耗率を減少させるための戦略を開発することを可能にするであろう。

【０００６】

現在までに、8つのシトクロムP450構造がX線結晶構造解析によって解明されており、公開ドメインとして利用できる。5つの構造は細菌のシトクロムP450に対応する：P450cam（CYP101 Poulosら、1985, J. Biol. Chem., 260, 16122）、P450BM3のヘムタンパク質ドメイン（CYP102 , Ravichandranら、1993, Science, 261, 731）、P450terp（CYP108, Hasemannら、1994, J. Mol. Biol. 236, 1169）、P450eryF（CYP107A1, Cupp-VickeryおよびPoulos, 1995, Nature Struct. Biol. 2, 144）、およびP450 14α-ステロールデメチラーゼ（CYP51, Podustら、2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 3068）。シトクロムP450norの構造は脱窒真菌Fusarium oxysporumから得られた（Shimizuら、2000, J. Inorg. Biochem. 81, 191）。最近、始原菌（古細菌）Sulfolobus solfataricus由来の好熱性シトクロムP450 (CYP119)の結晶構造が報告された（Yanoら、2000, J. Biol. Chem. 275, 31086-31092）。8番目の構造は、ウサギの2C5アイソフォームであって、哺乳類のシトクロムP450の初めての構造である（Williamsら、2000, Mol. Cell. 5, 121-131）。構造が解明されたシトクロムP450はすべて大腸菌（E,Coli）で発現された。現在までのところ、哺乳類シトクロムP450の結晶化が細菌のシトクロムP450と比較して特に困難であった理由は、これらのタンパク質の性質にある。細菌のシトクロムP450は可溶性であるのに対して、哺乳類のP450は内在性膜タンパク質である。哺乳類シトクロムP450は、膜に組み込むための切断不可能なシグナル配列として機能する、短くて疎水性の強いN末端セグメントによって小胞体の膜にはめ込まれている。哺乳類シトクロムP450タンパク質の残りの部分は細胞質スペース内に突出した球形構造をとる。

【０００７】

哺乳類のシトクロムP450の大半は肝臓にあるが、腸壁、肺、腎臓、副腎皮質および鼻粘膜上皮を含めて、他の臓器および組織は特定のシトクロムP450を高濃度に有している。いくつかのシトクロムP450酵素を哺乳類ミクロソームから単離することには成功したが、組織からの精製は重大事である。精製を困難にするのは、ヒト組織においてシトクロムP450を入手しにくいこと、限定された収率、高度のアミノ酸同一性を共有する強く関連したアイソフォームを分離するのが難しいこと、このタンパク質の疎水的な性質、界面活性剤の使用、および時に精製中に失活することである。組織からの精製法は、ミクロソーム膜の調製、膜結合型シトクロムP450の界面活性剤による抽出、連続的な精製ステップおよび最

終精製での界面活性剤の除去を必要とする。これらの手順に従って単離されたシトクロムP450は、強い凝集傾向、低い溶解性および乏しい単分散性を示し、結晶化につながらない特徴であった。

【０００８】

哺乳類シトクロムP450に関する構造研究は、単一のシトクロムP450の高濃度発現を可能にする異種発現系、ならびに溶液中のこのタンパク質の溶解性および性質を向上させるための配列の変更を併せて必要とすることがある。哺乳類シトクロムP450は、哺乳類細胞培養、酵母、バキュロウイルスおよび細菌を包含する多種多様な系において、今日では日常的に組換えタンパク質として発現される（Methods in Enzymology, Vol. 206, Academic Press, 1991を参照されたい）。生物物理学的研究もしくは構造研究を目的として、いくつかのミクロソームP450酵素を大量に低コストで発現するために細菌の系が良好に用いられた（Barnesら、1991, Proc. Natl. acad. Sci. USA 88 , 5597-5601）。大腸菌におけるいくつかの全長哺乳類シトクロムP450の発現は、現在では文献で十分に証明されている（Fisherら、1992, FASEB J. 6, 759-764; Richardsonら、1995, Arch Biochem. Biophys. 323, 87-96; Gillamら、1995, Arch. Biochem. Biophys. 317, 374-384）。大腸菌における発現を最適化するために有利となるように、タンパク質のN末端の2,3の残基の変更が記載されている。第2コドンをアラニン残基に変更することがよく用いられる。しかしながら、これらの全長シトクロムP450の物理的性質は、哺乳類組織から単離されたシトクロムP450について記載された内容ときわめて類似しており、したがって、結果として得られたタンパク質は、構造研究に受け入れられない可能性がある。

【０００９】

N末端の膜アンカー領域の欠失は、異種系で達成される高レベル発現と併せて、X線結晶構造解析のための、調製用の量の可溶性哺乳類シトクロムP450を得る手段を与えることができる。これは、N末端疎水性シグナル配列の除去によって、ミクロソーム膜アンカーを失った機能性シトクロムP450フォームが与えられるという仮説に基づく。こうしたタンパク質は、疎水性が低く、おそらくは可溶性ですらあって、推定されるようにX線結晶構造解析に供しやすいことが見込まれる。

【００１０】

N末端を除去することにより可溶性哺乳類シトクロムP450を作るいくつかの試みが、異なるグループによって文献に報告されている。シトクロムP450の類似したN末端欠失がいずれの場合にも用いられたが、ただし使用された精製法および得られた結果は大きく異なる。したがって、改善された、より一般的に適用可能な精製法が必要である。

【００１１】

Johnsonのグループはシトクロム P450 N末端の欠失を巧く利用して、初めて哺乳類P450のX線結晶構造を解明した（Williamsら、2000, Mol. Cell. 5, 121-131）。このグループ（Wachenfeltら、1997, Arch. Biochem. Biophys. 339, 107-114; Cosmeら、2000, J. Biol. Chem. 275, 2545-2553）は、N末端の残基3-21を欠失させて、ウサギ2C3および2C5アイソフォームを大腸菌で発現させた。結果は、トランケートされたタンパク質が細胞膜との塩依存的会合を示すことを明らかにし、膜貫通ドメインの除去が、こうした本来の膜タンパク質を、界面活性剤を使用せずに精製することができる表在性膜タンパク質に変換することを示唆する。その結果得られた精製タンパク質は、主に二量体および四量体であった。ウサギ・シトクロムP450 2C5の結晶化における困難は、膜貫通配列の除去、および膜結合に関与すると考えられる領域の改変を組み合わせることによって克服された。

【００１２】

Kempfら（Kempfら、1995, Arch. Biochem. Biophys., 321, 277-288）は、ヒト・シトクロムP450 2D6の、N末端25アミノ酸をN末端Metコドンに続くヘキサ-ヒスチジンで置換した一連の構築物の、大腸菌における発現を解析した。タンパク質を高濃度の塩で膜から可溶化した後、界面活性剤$C_{12}E_9$の存在下、もしくは非存在下で、Ni^{2+}キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、次いでDEAE-Sephacelおよびハイドロキシアパタイト樹脂を用いて精製した。その結果から、界面活性剤の非存在下では、タンパク質は

多量体状態への強い凝集傾向を示すことが明らかになった。50%を超えるタンパク質が高度に凝集する。非イオン系NP40を精製の間ずっと使用してサンプル中に保持する場合、タンパク質を単量体に解離させることができる。高度に精製するために3本のカラムが必要であり、最終的な収率は20%であった。

【００１３】

Gillamら (Gillamら、1995, Arch. Biochem. Biophys. 319, 540-550)は、ヒト シトクロムP450 2D6の一連のN末端修飾構築物の、大腸菌における発現を調べた。これらのうちのいくつかは、ある程度のシトクロムP450 2D6を生成したが、発現率には相当なばらつきがあった。最高の構築物はN末端疎水性領域の除去を伴うものであった。発現されたシトクロムP450を最初に界面活性剤Triton X114の存在下で膜から抽出した後、界面活性剤の存在下でフラボドキシンアフィニティーカラムおよびハイドロキシアパタイトを用いて精製した。最終調製物において透析によって、もしくは大量洗浄によって界面活性剤を除去した。その結果から、たとえその膜アンカー配列を欠失させても、当該タンパク質はなお膜に結合し、界面活性剤を用いて抽出する必要があることが明らかになった。シトクロムP450 2D6の全体的な回収率は20%未満である。タンパク質の凝集状態に関するデータは提示されなかった。

【００１４】

Perneckyら (Perneckyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 2651-2655)は、ウサギN切断型シトクロムP450 2B4および2E1、ならびにいくつかのキメラを大腸菌で発現させた。タンパク質を細菌溶解液から1% n-オクチル-β-D-グルコピラノシドで抽出し、続いてGSH-Sepharoseカラムで精製し、GSTタグを外すためにトロンビンで処理した。最後に、残存する界面活性剤をハイドロキシアパタイトカラムで調製物から除去した。結果から、界面活性剤の非存在下ではトランケート型シトクロムP450 2E1はやはり大部分が凝集し（5量体）、シトクロムP450 2B4は平均して8量体の大きさの高分子量凝集体の混合物であることが示された。このタンパク質を単量体型に変えるためには界面活性剤の添加が必要であった。

【００１５】

Larsonら (Larsonら、1991, J. Biol. Chem, 266, 7321-7324)は、アミノ酸3-29を欠いて、全長シトクロムP450と同様に大腸菌において発現されたウサギ・シトクロムP450 2E1が大部分は膜画分に存在することを明らかにした。pH 11で0.1M Na_2CO_3を用いてこのトランケート型シトクロムP450を膜から遊離できないことは、短くなったシトクロムP450が膜と一体となって結合している証拠を提供する。このタンパク質は、n-オクチル-β-D-グルコピラノシドを界面活性剤として使用して大腸菌の膜から可溶化した後、部分精製された。

【００１６】

Saragaら (Saragaら、1993, Arch. Biochem. Biophys. 304, 272-278)は、ウシ・ミクロソーム17β-ヒドロキシラーゼ シトクロムP450（P450c17）の、N-末端疎水性シグナルアンカー配列（残基2-17）を欠いた切断型を発現させた。その結果は、トランケート型シトクロムP450が主として膜に結合していることを示す。このタンパク質に関する情報は提示されなかった。

【発明の開示】

【００１７】

上記の先行技術のような努力にもかかわらず、今なおP450を組換え宿主細胞から、確実に、しかもX線結晶構造研究およびP450タンパク質に結合する小分子の結晶学的スクリーニングに供せられるのに十分な量および品質で、該タンパク質の結晶形成を可能にする収率で、精製する方法を開発する必要がある。精製されたP450タンパク質は、他の多くの目的、たとえば薬物を発見して薬物と上記分子との相互作用を分析するためのNMR研究およびハイスループットスクリーニング法にも有用である。

【００１８】

本発明は、P450の効率的な単離および精製を提供することによって先行技術の問題点を

克服することを目的とする。本研究において、本発明者らは、先行技術の問題はP450がその単離精製の間に凝集しやすい点にあることを見出した。本発明者らは、これまで判明していなかった上記の理由の１つが、当技術分野において、P450発現宿主細胞を溶菌前に低イオン強度のバッファーに再懸濁する必要があるとされる点にあると考えている。

【００１９】

加えて先行技術は、溶菌後、膜画分からP450を採取するために、細胞を界面活性剤と接触させる前に宿主細胞の膜画分を回収する（通常、高速超遠心による）必要があることも教示する。

【００２０】

これらのステップは、細胞溶解液からのP450の収率を低下させる。本発明者らは、ここで、分離した膜画分を回収する必要なしに細胞溶解液からP450を回収する方法を見出した。この方法は、回収プロセスの早い段階で高イオン強度（すなわち高い塩濃度）のバッファーを使用して、非凝集状態のタンパク質の高い回収率を与える。

【００２１】

したがって、第1の態様において、本発明はP450の精製法を提供するが、ここで前記方法は下記のステップを含んでなる：

(a) 宿主細胞の培養物においてシトクロムP450分子を発現させること；

(b) 前記培養物から前記細胞を回収し、12～110 mS/cmの電気伝導度を有する塩バッファー中に前記細胞を懸濁すること；

(c) 前記細胞を溶解し、細胞片を除去して高塩濃度溶解液を得ること；

(d) 前記溶解液に界面活性剤を添加して、高塩濃度-界面活性剤溶解液を得ること；ならびに

(e) 前記P450を前記溶解液から回収すること。

【００２２】

塩バッファーは、200～1000 mMの塩濃度を有することが好ましい。

【００２３】

界面活性剤は、0.015～1.2%v/vとなるよう添加することが好ましい。

【００２４】

あるいはまた、これは好ましくはないが、界面活性剤をステップ(c)で細胞片を除去する前に添加することができる。

【００２５】

もっとも好ましいのは、塩バッファーが200～1000 mMの塩濃度を有し、界面活性剤が0.015～1.2%v/vとなるように添加されることである。

【００２６】

回収ステップは一般に、高塩濃度-界面活性剤溶解液からのP450のアフィニティー精製を包含するが、これは高濃度の塩の存在が当面のイオン交換精製ステップという選択肢を除外するためである。

【００２７】

しかしながら、ひとたびP450がアフィニティー精製（たとえば、クロマトグラフィー）によって精製されたならば、結晶化できるように生成物のさらなる精製を可能にするために、塩を除去する必要がある。先行技術において、塩の除去は一般的には透析によって行われる。しかしながら、本発明者らは、このプロセスが数時間にわたって（通常12～24時間）徐々に塩を除くため、P450の凝集および変性を引き起こし、したがって望ましくないことを見出した。本発明者らは、迅速な脱塩がこうした問題をかなりの程度まで解決することを見出した。

【００２８】

したがって、もう一つの態様において、上記のステップ(e)は下記によって実施することができる：

(e(i)) 前記P450をアフィニティー担体に結合させること；

(e(ii)) 前記担体を高塩濃度-界面活性剤洗浄液中で洗浄すること；

(e(iii)) 高塩濃度-界面活性剤バッファー中に前記P450を取り出し、P450-高塩濃度-界面活性剤調製物を得ること；ならびに
(f) 調製物を迅速に脱塩してP450-低塩濃度調製物を取得すること。

【００２９】

ステップ(f)は、サイズ排除クロマトグラフィーによって、または同等の時間スケールの間に脱塩を与える他の方法によって、前記調製物から塩を除去することにより実施することが好ましい。

【００３０】

上記ステップe(i)-(iii)は、精製法の初期段階を通じてP450を高塩濃度の界面活性剤バッファー中に維持するが、そのことはP450の回収を促進する。

【００３１】

調製物をさらなる精製および不純物除去手順、たとえば陽イオン交換クロマトグラフィー、場合によっては、その後さらにサイズ排除クロマトグラフィー、に供することが可能であって、一層高度に精製されたタンパク質調製物が得られる。

【００３２】

回収されたタンパク質調製物を、たとえばハンギングドロップ法もしくは当技術分野の他の従来技法によって結晶化し、X線結晶構造解析に供することができる。もう一つの態様において、本発明はP450タンパク質分子の結晶、およびP450分子の結晶構造を得る方法を提供するが、この方法は前記結晶をX線回折に供すること、および得られた回折パターンを解析して前記P450の原子の3次元座標を決定することを含んでなる。

【００３３】

特定の態様において、本発明の結晶は、格子の大きさa=158Å、b=158Å、c=212Å、α=90°、β=90°、γ=120°、および空間群P321を有するP450 2C19である。別の態様において、本発明は、空間群I222および単位格子サイズa=77Å、b=99Å、c=129Å、β=90°を有する；もしくは空間群C2および単位格子サイズa=152Å、b=101Å、c=78Å、α=90°、β=120°、γ=90°を有する、3A4の結晶を提供する。

【００３４】

当業者であれば、結晶の格子の大きさが結晶化を繰り返すと、好ましくは1～2Å程度であるが、5%程度変動する可能性があり、こうした変動は本発明の精神および範囲に含まれることを認識するであろう。

【００３５】

本発明が下記のステップ：
(a) 宿主細胞培養においてシトクロムP450分子を発現させること；
(b) 前記細胞を前記培養物から回収すること、および前記細胞を200～1000 mMの伝導率を有する塩バッファー中に懸濁すること；
(c) 前記細胞を溶解し、細胞片を除去して、高塩濃度溶解液を提供すること；
(d) 前記溶解液に界面活性剤を添加して、高塩濃度-界面活性剤溶解液を得ること；ならびに
(e) 前記P450を前記溶解液から回収すること；
を含んでなるシトクロムP450の精製法を提供する限りにおいて、この方法は、残基220がプロリンで置換されたヒト2C9であるシトクロムP450分子を除外する。

【００３６】

不明確性を回避するために、上記の除外はタンパク質を膜内に埋め込むN末端セグメントのN末端欠失、トランケーション、および／または置換を有するもの、ならびにアフィニティー精製を可能にするポリペプチドタグを有するものを含めた、そういったあらゆるヒト2C9 P450を包含する。

【００３７】

P450結晶を調製するための上記方法によって得られたこのようなP450分子の使用、またはその後のそれらの解析使用も除外される。

【００３８】

下記のP450分子は、上記の但し書きに含まれる：
i) 配列番号77の2C9-FGループ
ii) 配列番号78または79の2C9P220分子
iii) 配列番号80の2C9-FGループK206E
iv) 220位がプロリンによって置換された、配列番号81の2C9野生型P450；場合によっては上記において
(a) 上記の(i)、(ii)、(iii)もしくは(iv)の前記2C9 P450分子が、N末端疎水性膜貫通ドメインのトランケーションを含んでなり、場合によりその領域を短いもの（たとえば1個以上（たとえば3、4または5個）の正に荷電したアミノ酸を含有する8～12アミノ酸配列）で置き換えてもよく、特にこの場合N末端配列は最初の30アミノ酸の代わりにMAKKTSSKGRとする；および／または
(b) (i)、(ii)、(iii)もしくは(iv)の前記2C9 P450分子が、タンパク質の回収および精製を可能にするC末端ポリヒスチジンタグのようなタグを含んでなる。4-ヒスチジンタグはそういったタグの１つである；および／または
(c) 220位にプロリン置換を有する2C9が、1～10個まで（1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個）のアミノ酸の、等価物もしくはより少ない数のアミノ酸による置換を包含する。

【００３９】

別の態様において、本明細書に提示した本発明の実施形態は、P450がいずれかのヒトP450タンパク質である場合に塩バッファーは500 mM KPiでないことを提供する。

【００４０】

発明の詳細な説明

シトクロムP450

本発明者らは、本発明の新規精製法が大半のシトクロムP450タンパク質に広く適用可能であると確信するが、それはその方法が精製の初期段階で可溶性の脱凝集形態の上記タンパク質を与えることを目的としているためである。

【００４１】

当該のシトクロムP450ファミリーはファミリーCYP1、CYP2、CYP3、CYP4、CYP5、CYP6、CYP7A、CYP7B、CYP8、CYP9、CYP10、CYP11、CYP12、CYP13、CYP14、CYP15、CYP16、CYP17、CYP18、CYP19、CYP21、CYP24、CYP26、CYP27、CYP46、CYP51 および CYP52を包含する。これらのうち、脊椎動物のシトクロムファミリー、すなわちファミリーCYP1、CYP2、CYP3、CYP4、CYP5、CYP7A、CYP7B、CYP8、CYP11、CYP17、CYP19、CYP21、CYP24、CYP26、CYP27、CYP46 および CYP51が特に注目される。

【００４２】

上記のうち、CYPサブファミリーは、1A (特に1A1および1A2)、1B (特に1B1)、2A (特に2A6、2A7、2A13)、2B (たとえば2B6)、2C (特に2C8、2C9、2C18および2C19)、2D (特に2D6)、2E (特に2E1)、2F (特に2F1)、2J (特に2J2)、3A (特に3A4、3A5および3A7)、4A (特に4A11、4A20)、4B (特に4B1)、4C、4D、4E、4F (特に4F2、4F3、4F8、4F11、4F12)、5A (特に5A1)、7A (特に7A1)、7B (特に7B1)、8A (特に8A1)、8B (特に8B1)、11A (特に11A1)、ならびに11B (特に11B1、11B2)サブファミリーを包含する。

【００４３】

上記のファミリーおよびサブファミリーのヒト遺伝子を含めて、ヒトシトクロムP450遺伝子は特に興味深い。遺伝子の配列は、SwissProtを含めて、多数の公開データベースで利用できる。ヒトP450は、1A1 (SwissProt P04798 (特に指示のない限り、下記の記載事項はすべてSwissProt))、1A2 (P05177)、1B1 (Genbank/EMBL U03688)、2A6 (P11509)、2A7 (P20853)、2A13 (Genbank/EMBL U22028)、2B6 (P20813)、2C8 (P10632)、2C9 (P11712)、2C18 (P33260)、2C19 (P33261)、2D6 (P10635)、2E1 (P05181)、2F1 (P24903)、2J2 (Genbank/EMBL U37143)、3A3 (P05184)、3A4 (P08684 or M18907)、3A5 (P20815)、3A7 (Genbank/EMBL NM_000765)、4A20 (Genbank/EMBL AJ131016)、4B1 (P13584)、5A1 (P24557)、4A11 (Genbank/EMBL L04751)、4F2 (Genbank/EMBL U02388)、4F3 (Q08477)、4F8 (Genbank/EMBL AF133298)、4F11 (Genbank/EMBL AF236085)、4F12 (Genbank/EMBL AC004523)、

7A (P22680)、7A1 (Genbank/EMBL X56088)、7B1 (Genbank/EMBL AF029403)、8A1 (Genbank/EMBL AF297048)、8B1 (Genbank/EMBL AF090318)、11A1 (P05108)、11B1 (P15538)、11B2 (P19099)、17 (P05093)、19 (P11511)、21 (P04033)、24 (Genbank/EMBL L13286)、CYP26 (Genbank/EMBL NM_000783)、27 (Q02318)、46 (Genbank/EMBL NM_006668)、および51 (Genbank/EMBL U23942)を包含する。

【００４４】

上記メンバーの非ヒト相同体、すなわち上記タンパク質に対して高度（>70%）の配列同一性を有する、本明細書の記載と同一のサブファミリーからの非ヒトタンパク質、も興味深い。他の哺乳類P450には、2D15 (Genbank/EMBL D17397) および 3A12 (P24463)といったイヌP450、ならびに3A1 (P04800)といったラットP450がある。

【００４５】

当該タンパク質の特別な一群は、ヒトCYP2 および CYP3ファミリーであるが、とりわけ2Cおよび2Dサブファミリーである。CYP2ファミリーには少なくとも7つのサブファミリーがあり、これらは2A6、2A7、2A13、2B6、2C8、2C9、2C18 および 2C19、2D6、2E1、2F1ならびに2J2を包含する。4つのヒト2CシトクロムP450分子、2C8、2C9、2C18 および 2C19は特に興味深い。3A4、3A5 および 3A7 CYPもまた、関心がもたれる。

【００４６】

本発明において、シトクロムへの言及は、全長膜結合型配列だけでなく、このタンパク質を膜内に埋め込むN末端セグメントの欠失を有する上記タンパク質も包含するものと理解されよう。このようなトランケート型タンパク質は、P450の精製を向上させる目的で、当技術分野において広く作製されている。たとえば、von Wachenfeldtら、Archives Biochem. Biophys. 339, 107-114, 1997を参照されたい。野生型タンパク質の対立遺伝子変異体および突然変異体もシトクロムへの言及によって本発明に包含される。

【００４７】

たとえば、2C19に関しては、11個の現在知られている対立遺伝子、すなわちCYP2C19*1A、CYP2C19*1B、CYP2C19*2A、CYP2C19*2B、CYP2C19*3、CYP2C19*4、CYP2C19*5A、CYP2C19*5B、CYP2C19*6、CYP2C19*7、および CYP2C19*8がある。上記およびその他のCYP対立遺伝子が当技術分野で知られている。上記の、および多くの他の対立遺伝子のリストの１つが、http://www.imm.ki.se/CYPalleles/で利用できる。3A4については、現在20個を越える既知の対立遺伝子変異体が、2D6については50個を越える変異体が存在する。

【００４８】

変異体は、野生型配列からの最低1個のアミノ酸の置換もしくは欠失を特徴とするP450である。このような変異体は、たとえば部位特異的突然変異誘発、または天然もしくは非天然アミノ酸の取り込みによって、作製することができる。したがって、変異体は、天然もしくは合成P450において少なくとも１つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えることによって、および／または、天然ポリペプチドの内部で、もしくはP450に相当するポリペプチドのNおよび／またはC末端でアミノ酸残基を付加および／または欠失させることによって得られるP450ポリペプチドである。

【００４９】

変異体を作製するために、前記タンパク質中に存在するアミノ酸を、同様の性質、たとえば、疎水性、疎水性モーメント、抗原性、αヘリックスもしくはβシート構造を形成もしくは破壊する性向など、を持つ他のアミノ酸で置き換えることができる。タンパク質の置換変異体は、そのタンパク質配列中の少なくとも1つのアミノ酸が除去されてその箇所に異なる残基が挿入された変異体である。アミノ酸置換は、一般に、単一残基についてであるが、機能的制約に応じてクラスターとすることもできる。アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換を包含することが好ましい。挿入的アミノ酸変異体は、1以上のアミノ酸が導入された変異体である。これは、配列内のみならずアミノ末端および／またはカルボキシ末端融合も可能である。

【００５０】

P450の立体構造に有意に干渉しないアミノ酸の置換、欠失および付加は、ひとつには、

置換、付加もしくは欠失の起こるP450の領域によって決まる。分子の高度に変動する領域においては、保存的置換のみならず非保存的置換も、分子の立体構造を有意に損なうことなく許容されることがある。高度に保存された領域、もしくは重要な二次構造を含む領域においては、保存的アミノ酸置換が好ましい。

【００５１】

保存的アミノ酸置換は当技術分野でよく知られており、関連するアミノ酸残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および／または両親媒性の類似に基づいて行われる置換を包含する。たとえば、負電荷を有するアミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸がある；正電荷を持つアミノ酸にはリジンおよびアルギニンが挙げられる；類似した親水値を有する非荷電極性ヘッド基をもつアミノ酸は、下記を包含する：ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン；アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；フェニルアラニン、チロシン。他のアミノ酸置換は当技術分野において周知のことである。

【００５２】

ある場合において、P450結合ポケットもしくは触媒残基に対してアミノ酸残基を置換、欠失、および／または付加することは、そのポリペプチドをコードするcDNAの中に使いやすいクローニング部位を与えるために特に有利または好都合であって、ポリペプチドの精製などに役立つ。このような、P450の立体構造を実質的に変化させない置換、欠失および／または付加は、当業者には明らかであろう。

【００５３】

変異体は、それらが誘導された元のP450野生型タンパク質の酵素活性を示すことが望ましい。

【００５４】

加えて、P450は、アフィニティ精製を可能にするポリペプチドタグを含むことができる。4～10個までのヒスチジン残基を有するポリヒスチジンタグはこの目的に好適である。他のタグとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼタグ（GST）、ストレプトアビジンタグ、MBP（マルトース結合タンパク質）タグ、CBD（セルロース結合ドメイン）タグ、もしくはHA（赤血球凝集素）タグなどのような、抗体が結合可能なエピトープタグがある。このようなタイプのタグは、学術的および商業的供給元から当業界で広範に利用できる。

【００５５】

タグは、P450のCもしくはN末端に付けることができる。

【００５６】

配列番号2は、本発明者らが結晶の調製に使用したトランケート型2C19 P450の配列を示す。もう一つの態様において、本発明は、本明細書に示されたトランケート型2C19の配列を有する単離されたタンパク質、およびその結晶を提供する。

【００５７】

宿主細胞

P450が発現される宿主細胞は、当業者が実験の都合上使用を希望する適当な宿主細胞なら、いずれでもよい。シトクロムP450分子は、大腸菌においてよく発現されるが、この宿主細胞のために多数のベクター系が存在し、これを使用することができる。

【００５８】

他の宿主細胞としては、酵母、たとえばS.cerevisiae、昆虫、または哺乳類、たとえばCHO細胞がある。前記および他の多くの宿主細胞タイプの発現系は、当技術分野で広く利用可能である。

【００５９】

P450が構成的に発現される、または誘導されるように、宿主細胞を構築することができる。

【００６０】

ひとたび宿主細胞が培養されてP450を発現したならば、細胞は当技術分野で利用可能な

標準的技法によって回収することができる。簡便な手段は、細胞を損なわずにペレット化させるように低速遠心によって細胞を回収することである。

【００６１】

本発明の方法はバッチ型の細胞培養に適しており、たとえば10～100リットルの大量バッチを除外するわけではないが、100 mlから10リットルまでの細胞のバッチ量は現行の実験設備でうまく処理することができる。

【００６２】

塩バッファー

これは細胞を懸濁するために使用される、高いイオン強度を有するバッファーである。それは、ただちに溶解して12～110 mS/cmの電気伝導度を有するバッファーをもたらす塩を含んでなる。このようなバッファーは、200～1000 mMの範囲の濃度を有する塩であることが望ましい。塩は、陰イオンのカリウムもしくはナトリウム塩であることが好ましい。望ましくは、陰イオンは塩素もしくはリン酸イオンでありうる。リン酸カリウム（KPi）が特に好ましい。

【００６３】

好ましい塩濃度は、25～35 mS/cm、たとえば約30 mS/cm、の電気伝導度を与えるように選択される。特に好ましい塩濃度は、500 mM前後、たとえば500±50 mMである。

【００６４】

バッファーは、pH範囲を6.5～8.0、好ましくは7.0～7.6に維持される。バッファーは、タンパク質の精製のために当技術分野で通常使用される他の試薬、たとえばグリセロール、β-メルカプトエタノール、DNアーゼ、pH緩衝剤、ヒスチジン、イミダゾールおよびプロテアーゼインヒビターなどを含有することができる。

【００６５】

細胞溶解

細胞は、たとえば音波処理、連続フローセル破壊、もしくはフレンチプレスに入れるといった物理的手段によって溶解することができるが、その結果、細胞壁が破壊されて細胞の内容物が塩バッファー中に分散する。フレンチプレスもしくは連続フローセル破壊装置内で上記を達成するために、10,000～20,000 psiで前記を作動させることができる。

【００６６】

細胞片を除去する（たとえば、約10,000～25,000 g (たとえば約22,000 g)での低速遠心によって、または70,000 gに達する短時間高速遠心による；すなわち、ホールセルはいずれもペレット化されるが、膜画分はペレット化しないようにする）。細胞片（たとえばペレット化した細胞）をもう1回溶解に供し、この、もう1回から得られた細胞片フリーの溶解液を前に得られた溶解液と合わせることができる。

【００６７】

その後、溶解液は、超遠心によって膜画分を単離する必要もなく、いつでもそのまま当該方法の次の段階に使用することができる。

【００６８】

界面活性剤

溶解液が得られたら、実験設備の制約を考慮しつつ、可能な限り速やかに溶解液に界面活性剤を添加することが望ましい。これは、細胞片フリーの溶解液を調製してから1時間以内に、好ましくは30分以内に、溶解液を界面活性剤と接触させることを意味する。

【００６９】

使用可能な界面活性剤は、分子および細胞生物学分野で生体物質の回収および処理に都合よく使用されるものである。多数の異なるタイプの界面活性剤がこの目的のために利用可能である。こうした界面活性剤の多くは、分子量が約350～1000、たとえば400～800の範囲である。それらは、陰イオン界面活性剤、たとえばコール酸もしくはその塩（たとえばナトリウム塩）およびデオキシコール酸もしくはその塩（たとえばナトリウム塩）、ならびに両性イオン界面活性剤、たとえばCHAPS（3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン スルホナート）を包含する。

【００７０】
特に好ましい種類の界面活性剤は、非イオン界面活性剤である。当技術分野で利用できる各種の非イオン界面活性剤がある。非イオン界面活性剤は、オクチル-β-D-グルコピラノシド；ポリエチレングリコールのエーテル、たとえばC2-10アルキルフェノールエーテル；およびアルキルポリオキシエチレンを包含する。このような化合物は分子量範囲が500～800 Daであって、Nonident™ P40、IGEPAL CA630、$C_{12}E_9$ および Triton™ X-100などを包含するが、これらは市販されている。

【００７１】
界面活性剤は、溶解液中の界面活性剤濃度が0.015%～1.2% v/vとなるように添加される。添加する界面活性剤の量は、0.1～0.5%の範囲が好ましいが、約0.15～0.4%がより好ましく、約0.2～0.4%、たとえば約0.3%がもっとも好ましい。

【００７２】
界面活性剤は、望ましくは溶解液のイオン強度の低下が10%を越えないような量で添加される。

【００７３】
P450の回収
本発明者らは、本発明に従って調製された上記の高塩濃度-界面活性剤溶解液が、当技術分野でこれまで経験したよりもはるかに高いレベルで単分散の形でP450タンパク質の回収をもたらすことを見出した。上記のように、塩濃度の高いバッファーの存在は、直ちにイオン交換クロマトグラフィーステップを行うことを妨げるが、次のステップとしてアフィニティー精製を行うことができる。

【００７４】
アフィニティー精製は、P450に対するリガンドが結合するようなアフィニティー担体マトリックスを用意する形をとることができる。担体は、樹脂、ビーズ（たとえばガラス、もしくはポリスチレンのようなポリマー）、磁性ビーズ、などとすることができる。P450がタグを含有する場合、リガンドはタグと同族のものとなり、たとえばヒスチジンタグの場合はNi-NTA、ストレプトアビジンタグの場合はビオチン、などである。リガンドはまた、HAタグのようなエピトープタグ、もしくはP450のエピトープのいずれかに対する抗体であってもよい。

【００７５】
P450が担体に結合する条件下で溶解液をアフィニティー担体と接触させる。結合後、担体を洗浄する。洗浄バッファーは高塩濃度-界面活性剤バッファーとすべきであるが、ここでこのバッファーは溶解液バッファーと同一でも異なっていてもよい。好ましくは同一である。もし異なる場合には、それでも、上記で指定されたような塩および界面活性剤濃度を有する。

【００７６】
洗浄後、P450を担体から分離させる。担体をカラムに詰め、高塩濃度-界面活性剤バッファー（前段落のものと同一でも、異なっていてもよい）を用いてP450を溶出することによってこれを行うことができるが、このバッファーはP450のリガンドからの分離をもたらすように改変されている。たとえば、Ni-NTAについては、バッファーはヒスチジンもしくはイミダゾールを、P450のHisタグを除去するのに十分に過剰な濃度で含有することができる。他の種類のタグについては、適当な競合物質を使用することができる。

【００７７】
脱塩
回収されたP450をその後、迅速な脱塩ステップによって脱塩する。本発明者らは、10～30分、好ましくは10分以内に高塩濃度からP450が分離されるような流速で、サイズ排除カラムをこの目的に使用することができることを見出した。その後、P450は、低塩濃度バッファーを用いたカラムからの溶出によって回収される。

【００７８】
何か１つの特定の理論に制約されることは望まないが、本発明者らは、たとえば透析に

よって徐々に脱塩することはP450の凝集および変性をもたらすが、迅速な脱塩ステップは相当程度、凝集を減らすと確信する。

【００７９】

低塩濃度バッファーは、上記の高塩濃度バッファーと同様の塩、たとえばナトリウムもしくはカリウム塩（塩化物もしくはリン酸塩など）が好ましく、この場合もリン酸カリウムが好ましい。「低塩濃度」とは50 mM未満を意味するが、20 mM未満が好ましく、さらに約10 mMが好ましい。この段階で、バッファー中に界面活性剤を保持する必要はない。

【００８０】

さらなる精製

脱塩ステップの後、即座に、すなわちサンプルを保存または凍結することなく、調製物をさらに精製に供することが望ましい。これは、脱塩した溶出液をそのまま次の精製カラムにかけることによって達成することができる。そうでない場合は、脱塩ステップからの溶出液を集めて1時間以内にカラムに供する。タンパク質調製物をさらに精製し、もしくは濃縮する目的で、多くの技法が当技術分野において知られているが、これらの例については、実施例でその概略を説明する。その例は、弱陽イオン交換カラム、たとえばカルボキシメチル-Sepharose™、BioRex™ 70、カルボキシメチル-Biogel™など、ならびに強陽イオン交換カラム、たとえばMonoSを包含し、これらは界面活性剤をさらに除去するために使用することができる。たとえば、脱塩したシトクロムP450をそのまま、あらかじめ10 mM Kpi、pH 7.4、20% グリセロール、0.2～2.0 mM DTT、1 mM EDTA（「バッファー1」）で平衡化させたCM Sepharose™カラム（たとえば、5 ml HiTrapカラム、Pharmacia）にアプライすることができる。その後、次の段階溶出プロトコールは、AKTA FPLCシステムで行うことができる；カラム容積の10～20倍容のバッファー1で洗浄し、界面活性剤を完全に除去するために、その後10～20倍容の10 mM KPi, PH 7.4、20% グリセロール、0.2～2.0 mM DTT、1mM EDTA、75 mM KCl もしくは NaClで洗浄する。その後、P450は、KClもしくはNaCl濃度を500 mMに増やした上記の後者のバッファーによって溶出される。

【００８１】

状況に応じて、上記に引き続いてサイズ排除カラム、たとえば、Superose™、Superdex™、Sephacryl™などを行うことも選択可能である。陽イオン交換もしくはサイズ排除ステップのいずれかから回収されたタンパク質を濃縮して、結晶化もしくは他の用途に適した溶液を得ることができる。20～120 mg/ml、たとえば20～80 mg/mlの濃度を、本発明を用いて達成することができる。

【００８２】

結晶形成

タンパク質の結晶を得るための多くの方法がそれなりに知られている。好都合なことに、タンパク質は最終的に、市販の濃縮装置を使用することによって高濃度の塩(たとえば500 mM NaClもしくはKCl)を用いて、10～100 mMリン酸カリウム中10～60 mg/ml、たとえば20～40 mg/ml、にまで濃縮される。タンパク質の結晶化は、0.5～2μlのハンギングドロップ法によって始められ、タンパク質は、ある範囲の蒸気拡散バッファー組成に対して、5～25℃にて蒸気拡散によって結晶化する。

【００８３】

一般的に、蒸気拡散バッファーは、0～27.5%、好ましくは2.5～27.5% PEG 1K-20K、好ましくは1-8K、もしくはPEG 2000MME-5000MME、好ましくはPEG 2000 MME、または0～10% Jeffamine M-600、および／または5～20%、たとえば10～20%プロパノール、もしくは15～20%エタノール、もしくは約15%～30%、たとえば約15% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール (MPD)を含んでなり、任意に0.01 M～1.6 Mの塩もしくは塩類、および／または0～0.15 M、たとえば0～0.1 Mの溶液バッファー、および／または0～35%、たとえば0～15%、のグリセロール、および／または0～35% PEG300-400を含む；しかしながら、好ましいのは：

10～25% PEG 1K-8K、もしくはPEG 2000MME、もしくは0～10% Jeffamine M-600、および／または5～15%、たとえば10～15%のプロパノールもしくはエタノールを含んでなり、

任意に0.1 M～0.2 M 塩もしくは塩類、および／または0～0.15 M、たとえば0～0.1 Mの溶液バッファー、および／またはPEG400を含む；しかしながら、さらに好ましいのは：15～20% PEG 3350もしくはPEG 4000もしくはPEG 2000MME、または0～10% Jeffamine M-600、または5～15%、たとえば10～15%のプロパノールもしくはエタノールを含んでなり、任意に0.1 M～0.2 M 塩もしくは塩類、および／または0～0.15 M 溶液バッファーを含む。

【００８４】

塩は、ハロゲン化物（たとえば臭化物、塩化物もしくはフッ化物）、酢酸、ギ酸、硝酸、硫酸、酒石酸、クエン酸またはリン酸のアルカリ金属（特にリチウム、ナトリウムおよびカリウム）、アルカリ土類金属（たとえばマグネシウムもしくはカルシウム）、アンモニウム、鉄（III）、鉄（II）、または遷移金属（たとえば亜鉛）塩とすることができる。これは、フッ化ナトリウム、フッ化カリウム、フッ化アンモニウム、酢酸アンモニウム、酢酸リチウム、酢酸マグネシウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸カルシウム、酢酸亜鉛、塩化アンモニウム、塩化リチウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、臭化カリウム、ギ酸マグネシウム、ギ酸ナトリウム、ギ酸カリウム、ギ酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸リチウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、硫酸カリウム、硫酸リチウム、硫酸ナトリウム、酒石酸二ナトリウム、酒石酸ナトリウムカリウム、酒石酸二アンモニウム、リン酸二水素カリウム、クエン酸三ナトリウム、クエン酸三カリウム、酢酸亜鉛、塩化鉄（III）、塩化カルシウム、硝酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム、クエン酸三リチウム、塩化ニッケル、ヨウ化アンモニウム、クエン酸水素二アンモニウムを包含する。

【００８５】

溶液バッファーは、もしあるとすれば、たとえば、Hepes、Tris、イミダゾール、カコジル酸塩、クエン酸三ナトリウム／クエン酸、クエン酸三ナトリウム／HCl、酢酸／酢酸ナトリウム、リン酸塩-クエン酸塩、リン酸カリウムナトリウム、2-(N-モルホリノ)-エタン スルホン酸／NaOH (MES)、CHES、またはビス-トリスプロパンを包含する。

【００８６】

pH範囲は4.2～8.5に維持されることが望ましく、4.7～8.5が好ましい。

【００８７】

結晶は、Hampton Research社スクリーニングキット、ポリエチレングリコール（PEG）／イオンスクリーン、PEGグリッド、硫酸アンモニウムグリッド、PEG／硫酸アンモニウムグリッドなどを使用して、調製することができる。

【００８８】

P450のインヒビター、たとえば、フルオロキサミンもしくは2-フェニルイミダゾールの存在下で結晶化を行うこともできる。

【００８９】

結晶化に影響を与えることが確認された添加剤を結晶化条件に加えることができる。添加剤の存在がサンプルの結晶化を助け、しかもその添加剤が結晶の質を高めることができる場合には、予備的な結晶化条件の最適化の際に、Additive Screens、たとえばHampton Additive Screensを使用すべきである。このAdditive Screensはグリセロール、ポリオール、およびタンパク質結晶化における他のタンパク質安定化剤を使用し（R. Sousa. Acta. Cryst. (1995) D51, 271-277）、もしくは二価陽イオンを使用する（Trakhanov, S. およびQuiocho, F.A. Protein Science (1995) 4,9, 1914-1919）。

【００９０】

本発明は下記の実施例によって説明される。

【実施例】

【００９１】

発現ベクター

オレゴン大学（University of Oregon, Eugene, Oregon）のF.W. Dahlquist教授から提

供された発現ベクターpCWOri+を使用して、トランケート型ヒトシトクロムP450を大腸菌株XL1 Blue（Stratagene）において発現させた。5’末端を修飾したシトクロムP450 cDNAをpCWOri+ベクターのポリリンカー内のNdeI/SalIクローニング部位に導入した。膜貫通ドメインを構成する、ヒトシトクロムP450 2C9および2C19の天然のN末端の残基2-29を、モチーフAKKTSSKGR（配列番号9、図1）によって置換した。タンパク質の発現を向上させるために第2コドンとしてアラニンを導入した。高塩濃度バッファー中でのタンパク質の精製を容易にするために4ヒスチジンタグを3’末端に挿入した。2C19タンパク質のコード配列を配列番号1として示す。

【００９２】

細菌発現

XL1 Blue細胞のただ１つのアンピシリン耐性コロニーを、Terrific Broth (TB) 中で37℃にて一晩、ほとんど飽和するまで撹拌しながら増殖させ、それを新しいTB培地に接種するために使用した。mlあたり100μgのアンピシリンを含有するTB培地中で37℃、200 rpmで、OD600nm = 0.4となるまで細菌を増殖させた。ヘム前駆体δ-アミノレブリン酸（80 mg/ml）を、誘導の15分前に、1 mM IPTGとともに添加し、その後温度を30℃に変化させた。穏やかに撹拌しながら（185 rpm）30℃にて48～72時間、細菌培養を続けた。

【００９３】

タンパク質の精製 - 実施例1(a)

10000 x gで10分間、細胞を遠心によりペレット化し、500 mM Kpi、pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、プロテアーゼインヒビターカクテルの1:1000希釈物(Calbiochem)、0.01 mg/ml (約40 U/ml) DNアーゼ1 および 5 mM $MgSO_4$中に再懸濁した。最終容量は、培養物リットル当たり多くても50 mlである。

【００９４】

Constant Systems社の細胞破砕装置に12000 psiで2回通すことによって細胞を溶解した。その後、70000 x gで4℃にて30分間遠心することによって細胞片を除去した。

【００９５】

界面活性剤IGEPAL CA630 (Sigma) を最終濃度0.3% (v/v)となるように細胞溶解液に1滴ずつ添加し、その溶解液を、あらかじめ洗浄した NiNTA 樹脂(Qiagen) とともに一晩4℃にて撹拌しながらインキュベートした。NiNTA 樹脂を4℃にて2000 xg で2分間遠心することによってペレット化し、樹脂の20倍容の500 mM KPi、pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、50 mM グリシン、プロテアーゼインヒビターカクテルの1:1000 希釈物、0.3%(v/v) IGEPAL CA630で洗浄し、樹脂を4℃にて2000 xg で2分間遠心することによってペレット化した。その樹脂を10倍容の500 mM KPi、pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、7.5 mM ヒスチジン、プロテアーゼインヒビターの1:1000 希釈物、0.3% IGEPAL CA630 で洗浄し、樹脂を上記のように遠心することによって回収した。最終的に、この樹脂を4℃にてカラムに充填し、シトクロムP450を500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、100 mM ヒスチジン、プロテアーゼインヒビターカクテルの1:1000 希釈物、0.3%(v/v) IGEPAL CA630で溶出した。

【００９６】

NiNTAカラムから得られたシトクロムP450 を、AKTA FPLC システム (Pharmacia) のHiPrep 26/10 脱塩カラム(Pharmacia)を用いて速やかに (<10分)、10 mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、0.2 mM DTT、1mM EDTA 中に脱塩した。このとき流速は5ml／分で、16 mlの画分を集めた。脱塩されたシトクロムP450をそのまま、あらかじめ10 mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、0.2 mM DTT、1 mM EDTA で平衡化したCM Sepharose カラム(Pharmacia)にかけた。その後、次の段階溶出プロトコールをAKTA FPLC システムによって実施する；界面活性剤を完全に除去するためにカラム容積の20倍容の 10mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、0.2mM DTT, 1mM EDTA, 75 mM KCl で洗浄し、濃度を500 mMに上昇させたKClを有する上記バッファーで溶出する。表1および表2はそれぞれ上記のステップによる2C9および2C19の回収率を示す。

【表１】

表１ － 2C9 の精製表

精製段階	2C9 ナノモル	回収率%
溶解液	708	100
NiNTA プール	534	75.4
CM Sepharose 通り抜け	6.7	0.95
CM Sepharose プール	566	80.0

【００９７】

【表２】

表２ － 2C19 の精製表

精製段階	2C19 ナノモル	回収率%
溶解液	847	100
NiNTA 7.5mM ヒスチジン洗浄	130	15.0
NiNTA プール	842	99.0
CM Sepharose 通り抜け	7.0	0.9
CM Sepharose プール	653	77.0

【００９８】

P450画分は微量濃縮装置（セントリプレップ（Centriprep）もしくはセントリコン（Centricon）30）を用いて濃縮した。P450結晶はこの調製物から得られた。

【００９９】

上記のプロトコールの繰り返しでは、CM Sepharoseカラムから得られたP450サンプルをSuperose 6 HR10/30ゲル濾過カラム（Pharmacia）の上部にアプライし、100 mM KPi, pH7.4、300 mM KCl、20% グリセロール、0.2 mM DTTを含有するバッファーを用いて0.2 ml/分で溶出した。タンパク質を集め、結晶化アッセイのためにセントリコンを用いて40 mg/mlまで濃縮した。

【０１００】

タンパク質の精製 - 実施例1(b)

P450 2C19を上記のように細菌で発現させて、細胞を10000 x gで10分間遠心してペレット化し、500 mM KPi, pH7.4、20 % グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、プロテアーゼインヒビターカクテル(Calbiochem)の1:1000 希釈物、10 mM イミダゾール、0.01 mg/ml DNアーゼ1 および5 mM $MgSO_4$中に再懸濁した。最終的な容積は多くても培養物リットルあたり50 mlである。

【０１０１】

Constant Systems社の細胞破砕装置に12000 psiで2回通すことによって細胞を溶解した。その後70000 xgで4℃にて30分間遠心することによって細胞片を除去した。

【０１０２】

界面活性剤IGEPAL CA630 (Sigma)を、最終濃度0.3% (v/v)となるように細胞溶解液に1滴ずつ添加し、その溶解液を、あらかじめ洗浄した NiNTA 樹脂(Qiagen) とともに一晩4℃にて撹拌しながらインキュベートした。NiNTA 樹脂を4℃にて2000 xg で2分間遠心してペレット化し、樹脂の20倍容の500 mM KPi、pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、10 mM イミダゾール、プロテアーゼインヒビターカクテルの1:1000 希釈物、0.3%(v/v) IGEPAL CA630で洗浄し、樹脂を4℃にて2000 xg で2分間遠心することによってペレットとした。その樹脂を10倍容の500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、20 mM イミダゾール、プロテアーゼインヒビターの1:1000 希釈物、0.3% IGEPAL CA630 で洗浄した後、樹脂の5倍容の500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、50 mM イミダゾール、プロテアーゼインヒビターの1:1000 希釈物、0.3% IGEPAL CA630 で洗浄した。洗浄の合間に、樹脂を上記のように遠心することによって回収した。最終的に、この樹脂を4℃にてカラムに充填し、シトクロムP450を500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、300 mM イミダゾール、プロテアーゼインヒビターカクテルの1:1000 希釈物、0.3%(v/v) IGEPAL CA630で溶出した。

【０１０３】

その後P450画分を、Vivaspin 30微量濃縮装置（セントリプレップもしくはセントリコン30微量濃縮装置に等しい）を用いてほぼ上記のように濃縮した。タンパク質結晶を調製するために回収された画分を使用した。このプロトコールの繰り返しでは、タンパク質画分をSuperose 6 HR10/30ゲル濾過カラムにかけて、結晶化の前に既述のように溶出した。

【０１０４】

品質評価

CM SepharoseまたはSuperose 6から得られた最終調製物の品質を下記によって評価した：

市販のゲル（Nugen）をメーカーの使用説明書にしたがって用いてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、続いてCBB染色を行った。ゲルのデジタル画像をスキャンすることによって推定される純度は、95%を下回らないと推定された。

【０１０５】

凝集状態を評価するために、Superose 6 HR10/30カラム（Pharmacia）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーを行った。このカラムの分画範囲は5 x 10^3から5 x 10^6 Daまでであって、したがって、大きな複合体の分割によく適合する。カラムを、100 mM KPi, pH7.4、300 mM KCl、20% グリセロール、0.2 mM DTTを含有するバッファーを用いて0.2 ml/分で溶出した。およそ40 mg/mlの濃度の0.2 mlタンパク質サンプルを使用した。280 nmでの吸光度をモニターし、ピークを集めて、動的光散乱を用いて分析した。

【０１０６】

光散乱

830.3 nmでのレーザー照射を用いて、90°にて蛍光光度計石英セル内でDLSによってサンプル（0.15 ml）を分析した。データは、広範なダイナミックレンジにわたる変動可能な広がりを有するログ相関器を用いて、集められた。すべての測定は、ゲル濾過カラムから直接集められたサンプルを用いて20℃にて行われた。実施は、通常、平均してそれぞれ10秒を10回行った。分子量の推定値を得るために、摩擦比1.26および偏比容0.726を用いた。

【０１０７】

本発明の新規精製法を用いて調製されたサンプルは、下記によって示されるように、すぐれた溶解性を有し、顕著な凝集の欠如を示した：

- 遠いチャンネル外挿と測定された平均散乱との比が常に0.999から1.003の間にある；
- 平均計数率が有意に変動せず、標準偏差は約1%程度であった；
- 両側指数フィッティングによる自己相関関数の解析から、2C9は推定分子量約180 kDaを有し、2C19は推定分子量約160 kDaを有することが示されたが、すなわち両者はともにわずか4個のサブユニットからなるオリゴマーである；

- サンプルが20℃で（24時間にわたって）良好な安定性を示す。

【０１０８】

公開されたプロトコールによって調製されたサンプルは、ひどい凝集の徴候を示す：

- 標準偏差が10%を超える、散乱光強度の大きな揺らぎ；
- 自己相関関数の解析が、非常に緩慢な指数関数的減衰を示し、多数のP450サブユニットからなる大きな凝集物（分子量＞10^6Da）の存在を示した。これらのサンプルは高度の多分散性も示す；
- サンプルはまた時間の関数としてさらなる凝集を示す。

【０１０９】

公開された方法により調製されたサンプル中の、上記のような深刻な凝集の徴候は、20nm孔径を通したサンプル濾過もしくは200,000gにて30分間の遠心後もなお見られた。

【０１１０】

実施例１(c)

細菌での発現

P450 2C19を発現する細胞を上記1(a)のように増殖させた。

【０１１１】

タンパク質精製

細胞を10000gで10分間遠心してペレット化し、500 mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、0.1%(v/v) プロテアーゼインヒビターカクテル (Calbiochem)、10 mM イミダゾール、40U/ml DNアーゼ 1 および 5 mM $MgSO_4$を含有するバッファー中に再懸濁した。

【０１１２】

Constant Systems社の細胞破砕装置に10000 psiで2回通すことによって細胞を溶解した。その後、22000 gで4℃にて30分間遠心することによって細胞片を除去した。

【０１１３】

界面活性剤IGEPAL CA630 (Sigma) を、10%ストック溶液から、最終濃度0.3%(v/v)となるように細胞溶解液に1滴ずつ添加し、その溶解液を、あらかじめ洗浄した NiNTA 樹脂(Qiagen) とともに一晩4℃にて撹拌しながらインキュベートした。タンパク質の結合したNiNTA 樹脂を4℃にて2000 g で2分間遠心することによってペレットとした。樹脂の20倍容の500 mM KPi、pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、10 mM イミダゾール、プロテアーゼインヒビターカクテルの1:1000 希釈物、0.3%(v/v) IGEPAL CA630で樹脂を洗浄し、樹脂を4℃にて2000 xg で2分間遠心することによってペレットとした。次にその樹脂を10倍容の500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、20 mM イミダゾール、0.1%(v/v)プロテアーゼインヒビター、0.3% IGEPAL CA630 で洗浄し、上記のように遠心することによって樹脂を回収した。

【０１１４】

この樹脂を4℃にてカラムに充填し、シトクロムP450を500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、300 mM イミダゾール、0.1%(v/v)プロテアーゼインヒビターカクテル、0.3%(v/v) IGEPAL CA630で溶出した。

【０１１５】

NiNTAカラムから得られたシトクロムP450 を速やかに、HiPrep 26/10 脱塩カラム(Pharmacia)を用いて、流速5ml/分で、10 mM KPi, pH7.4、20% glycerol、2.0 mM DTT、1mM EDTA 中に脱塩した。

【０１１６】

脱塩されたシトクロムP450をそのまま、あらかじめ10 mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、2.0 mM DTT、1 mM EDTA で平衡化したCM Sepharose カラム(Pharmacia)にかけた。次の段階溶出が適用された：カラム容積の20倍容の 10mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、2.0mM DTT、1mM EDTAで洗浄し、界面活性剤を完全に除去するために75 mM KClを含む上記バッファーで洗浄し、その後、KCl濃度を500 mMに高めた上記バッファーで溶出した。

【０１１７】
タンパク質は、結晶化アッセイのために微量濃縮装置を用いて40 mg/mlまで濃縮した。
【０１１８】
機能性アッセイ
P450 2C9および2C19に関する活性測定は、LS分光計(Perkin Elmer Instruments)を用いて蛍光法により実施した。
【０１１９】
20ピコモルのP450 2C9を、0.1ユニットの精製ヒト・オキシドレダクターゼを用いて、基質である100μMのメトキシ-4-(トリフルオロメチル)-クマリン、NADPH再生系（これは1.3 mM $NADP^+$、3.3 mM グルコース-6-リン酸、および0.1ユニットのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを包含する）の存在下に、最終容積300μlの25 mM KPi, pH7.4、3.3 mM $MgCl_2$中で再構成した。37℃で数分間インキュベートし、7-ヒドロキシ-4-(トリフルオロメチル)-クマリンを代謝産物の標準品として使用して、代謝速度を測定した。使用した励起波長および発光波長はそれぞれ409および530 nmとした。2C9の活性は、0.94 ± 0.09 nmol/分/nmol P450であると測定された。
【０１２０】
P450 2C19に関する活性測定は、20ピコモルのP450 2C19を用いて行われ、0.1ユニットの精製ヒト・オキシドレダクターゼを用いて、基質である10μMジベンジルフルオレセイン、NADPH再生系（これは1.3 mM $NADP^+$、3.3 mM グルコース-6-リン酸、および0.1ユニットのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを包含する）の存在下で、最終容積300μlの25 mM KPi, pH7.4、3.3 mM $MgCl_2$中で37℃にて再構成した。ヒドロキシ-ジベンジルフルオレセインを代謝産物標準品として使用した。使用した励起波長および発光波長はそれぞれ485および538 nmとした。2C19の活性は、1.27 ± 0.06 nmol/分/nmol P450であると測定された。
【０１２１】
結晶化
P450 2C19の結晶化は、0.1 M HEPES, pH6.0、1.6 M 硫酸アンモニウム、2.5% PEG 6000に対して20～40 mg/mlのタンパク質で達成された。結晶は2週間の期間をかけて、初期沈澱から濃褐色の針状晶として成長した。
【０１２２】
P450 2C19のさらなる結晶化を、次のようなさまざまな条件に対して10～60 mg/mlのタンパク質濃度で行った：
0.15 M～0.2 Mフッ化アンモニウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 Mフッ化ナトリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 Mフッ化カリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 塩化アンモニウム、15～20% PEG3350;
0.15 M～0.2 M 塩化リチウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 塩化マグネシウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.3 M 塩化ナトリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 塩化カリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 硝酸ナトリウム、15～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 硝酸リチウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 硝酸カリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 硝酸アンモニウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M ギ酸マグネシウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M ギ酸ナトリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M ギ酸カリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M ギ酸アンモニウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 酢酸アンモニウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M酢酸リチウム、15%～20% PEG 3350;

0.15 M～0.2 M酢酸ナトリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M酢酸カリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 硫酸リチウム一水和物、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M硫酸ナトリウム十水和物、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M硫酸カリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M硫酸アンモニウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 酒石酸二ナトリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 酒石酸ナトリウムカリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M 酒石酸二アンモニウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M リン酸二水素カリウム、15%～20% PEG 3350;
0.15 M～0.2 M クエン酸三カリウム、15%～20% PEG 3350;
20% PEG 3350;
0.05～0.2 M イミダゾールpH 7.0～8.0、10～20% 2-プロパノール、0～15% PEG400;
0.1 M Tris pH 8.5、20% PEG 1000;
0.1 M クエン酸三ナトリウムpH 5.5～5.6、20% PEG 3000;
0.1 M Tris pH 7.0～7.6、15～25% PEG 2000MME;
0.1 M Hepes pH 7.2～7.6、0～0.2 M NaCl、20～25% PEG 3000;
0.1 M イミダゾールpH 8.0、0.2 M 酢酸カルシウム、10% PEG 8000;
0.01 M 塩化鉄(III)六水和物、0.1 M クエン酸三ナトリウム二水和物pH 5.6、0～10% Jeffamine M-600;
0.1 M カコジル酸ナトリウム、pH 6.5、0.2 M 硫酸アンモニウム、15～30% PEG 8000;
0.1 Mカコジル酸ナトリウム、pH 6.5、0.2 M 酢酸マグネシウム、10～20% PEG 8000;
0.1 Mカコジル酸ナトリウム、pH 6.5、0.2 M酢酸亜鉛、9～18% PEG 8000;
10% 2-プロパノール;
0.1 M Tris pH 7.0～7.4、15 % 2-プロパノール;
0.3 M酢酸ナトリウム、0.1 M イミダゾール-HCl pH 7.0、25% MPEG 2K;
0.2 M 硫酸リチウム、0.1 M イミダゾール-HCl pH 7.0、25% MPEG 2K;
0.2 M 臭化カリウム、0.1 M イミダゾール-HCl pH 7.0、25% MPEG 2K;
0.1 M HEPES、pH 7.0～7.5; 5～10% 2-プロパノール、10～20% PEG 4000、0～15% グリセロール;
0.1 M Tris pH 7.0～8.2、15～20% エタノール;
0.1 M Tris pH 7.0～7.6、20～27.5% PEG 3000;
0.1 M HEPES、pH 7.2～7.4; 15～20% PEG 8000;
0.1 M カコジル酸、pH 7.0; 15～25% PEG 2000MME;
0.1 M イミダゾール、pH 7.0、15～25% PEG 2000MME;
0.1 M Tris pH 7.0～7.6、0～0.2 M 酢酸カルシウム、20～25% PEG 3000;
0.1 M HEPES pH 7.4、0～0.1 M 酢酸カルシウム、20% PEG 3000;
0.1 M HEPES pH 7.0～7.2、20% PEG 2000MME;
0.05～0.085 M Tris pH 8.4～8.5、0.2 M 硫酸リチウム、25～25.5% PEG 4K、0～15 グリセロール;
0.05～0.25 M K2HPO4、15～25% PEG 3350、0～10% グリセロール;
0.10 M カコジル酸ナトリウム、pH 6.6、20% PEG 3350;
0.10 M カコジル酸ナトリウム、pH 6.5、0.20 M 酢酸マグネシウム、15% MPD;
0.05 M KH2PO4、10% PEG 8000;
0.10 M 酢酸、pH 4.5、0.20 M 酢酸亜鉛、20% PEG 1000;
0.10 M 酢酸、pH 4.5、0.20 M 酢酸カルシウム、30% PEG 400;
0.10 M 酢酸、pH 4.5、0.20 M 塩化ナトリウム、1.26 M 硫酸アンモニウム;
0.10 M Tris-HCl、pH 8.5、0.20 M 塩化マグネシウム、15% PEG 4000;
0.10 M HEPES、pH 7.5、0.20 M 塩化マグネシウム、15% イソプロパノール;
0.10 M HEPES、pH 7.5、0.20 M 塩化マグネシウム、15% PEG 400;

0.10 M HEPES、pH 7.5、0.75 M 硫酸リチウム;
0.10 M リン酸-クエン酸、pH 4.2、0.20 M 硫酸リチウム、20% PEG 1000;
0.10 M リン酸-クエン酸、pH 4.2、0.20 M 塩化ナトリウム、10% PEG 3000;
0.10 M リン酸-クエン酸、pH 4.2、0.20 M 硫酸アンモニウム、20% PEG 300、10% グリセロール;
0.085 M クエン酸三ナトリウム二水和物pH 5.6、0.2 M 酢酸アンモニウム、25.5% PEG 4K、15% グリセロール;
0.10 M クエン酸三ナトリウム二水和物、pH 5.6、0.20 M 酢酸アンモニウム、15% PEG 4000;
0.1 M クエン酸三ナトリウム-HCl、pH 5.6、10% PEG 4000、10% イソプロパノール;
0.10 M クエン酸ナトリウム、pH 5.5～5.6、20% PEG 3000;
0.10 M リン酸Na/K、pH 6.2、0.20 M 塩化ナトリウム、20% PEG 1000;
0.10 M MES、pH 6.0、0.20 M 酢酸亜鉛、10% PEG 8000。

【０１２３】

結晶は2週間の期間にわたって様々な形態 － 濃褐色針状晶、六方晶柱、もしくは楕円体 － に成長した。

【０１２４】

X線結晶構造解析による結晶の解析から、2C19のトランケート型タンパク質の結晶は、格子の大きさがa=158Å、b=158Å、c=212Å、α=90°、β=90°、γ=120°であって空間群P321であることが明らかになった。格子の大きさは繰り返し結晶化すると1から2Åだけ変動する可能性があり、これらの大きさへの言及は、こうした変動への言及を包含する。

【０１２５】

2C9の結晶化は、200 mM 硫酸アンモニウム、100 mM MES, pH 6.0、5～30% PEG 6000中の20 mg/mlで得られた。2C9の小さな結晶が2週間かけて、塊になった茶色のブロックとして出現した。

【０１２６】

2C19の結晶化

ある範囲の条件下でインヒビターとともに2C19を結晶化した。10倍モル過剰（通常3.7～7.4 mM）のインヒビター、たとえばフルボキサミンもしくは2-フェニルイミダゾールを水またはエタノールに懸濁して、典型的な例では20～40 mg/mlの2C19 P450タンパク質の溶液に添加した。得られた混合物を4℃にて10～60分間インキュベートした。その結果得られたインヒビター-タンパク質混合物を、上記プロトコールから選択された方法による結晶化の試行に使用した。

【０１２７】

実施例2： 2C19-1Bの結晶化

Richardsonら(Arch. Biochem. Biophys. 323(1):87-96 (1995))によってすでに特性が明らかとなっている野生型2C19*1B cDNAを作製した。もともとは二重変異体2C19*1B R150H D414H（上記クローン2C19）が分離され、発現された。この変異体を、Stratagene社製Quick Changeキットを用いて部位特異的突然変異誘発によって2段階で野生型2C19*1B配列（下記配列番号3および配列番号4に示す）に戻した。

【０１２８】

2C19-1Bの構築

オレゴン大学（University of Oregon, Eugene, Oregon）のF.W. Dahlquist教授から提供された発現ベクターpCWOri+を使用して、トランケート型ヒトシトクロムP450を大腸菌株XL1 Blue（Stratagene）において発現させた。

【０１２９】

Richardsonら(Arch. Biochem. Biophys. 323(1):87-96 (1995))によってすでに特性が明らかとなっている野生型2C19*1B cDNAをもとにした野生型クローン2C19-1Bを、クローン2C19に存在する2個の変異をStratagene社製Quick Changeキットを用いて部位特異的突然変異誘発によって2段階で正すことによって作製した。H150Rの復帰突然変異は次の相補

的オリゴヌクレオチド対：
5’CAAGAGGAAGCCCGCTGCCTTGTGGAGGAG3’ (配列番号12)および
5’CTCCTCCACAAGGCAGCGGGCTTCCTCTTG3’ (配列番号13)を用いて行われた。

【０１３０】

H414Dの復帰突然変異は、次の相補的オリゴヌクレオチド対5’CCCTCGTCACTTTCTGGATGAAGGTGGAAATTTTAAG3’（配列番号14）および5’CTTAAAATTTCCACCTTCATCCAGAAAGTGACGAGGG3’（配列番号15)を用いて行われた。元に戻ったコドンに下線を付す。

【０１３１】

細菌での発現

XL1 Blue細胞の単一のアンピシリン耐性コロニーを、ほぼ飽和状態まで振盪しながらTerrific Broth(TB)中で37℃にて一晩増殖させて、新しいTB培地に接種するために使用した。細菌は、2リットル容フラスコで185 rpm、37℃にて、アンピシリン100μg/mlを含有するTB培地1リットル中で、OD600nm=0.4まで増殖した。ヘム前駆体δ-アミノレブリン酸（80 mg/l）を1 mMイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）による誘導の30分前に添加して、温度を25℃に下げた。撹拌下で25℃にて72時間、細菌の培養を続けた。

【０１３２】

タンパク質の精製

細胞を10000gで10分間遠心してペレット化し、500 mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、0.1%(v/v) プロテアーゼインヒビターカクテル (Calbiochem)、10 mM イミダゾール、40U/ml DNアーゼ 1 および 5 mM $MgSO_4$を含有するバッファー中に再懸濁した。

【０１３３】

Constant Systems社の細胞破砕装置に10000 psiで2回通すことによって細胞を溶解した。その後、22000 gで4℃にて30分間遠心することによって細胞片を除去した。

【０１３４】

界面活性剤IGEPAL CA630 (Sigma) を、10%ストック溶液から、最終濃度0.3%(v/v)となるように細胞溶解液に1滴ずつ添加し、その溶解液を、あらかじめ洗浄した NiNTA 樹脂(Qiagen) とともに一晩4℃にて撹拌しながらインキュベートした。タンパク質の結合したNiNTA 樹脂を4℃にて2000 g で2分間遠心することによってペレット化した。樹脂の20倍容の500 mM KPi、pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、10 mM イミダゾール、プロテアーゼインヒビターカクテルの1:1000 希釈物、0.3%(v/v) IGEPAL CA630で樹脂を洗浄し、樹脂を4℃にて2000 xg で2分間遠心することによってペレットとした。次にその樹脂を10倍容の500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、20 mM イミダゾール、0.1% (v/v)プロテアーゼインヒビター、0.3% IGEPAL CA630 で洗浄し、上記のように遠心することによって樹脂を回収した。

【０１３５】

この樹脂を4℃にてカラムに充填し、シトクロムP450を500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、300 mM イミダゾール、0.1%(v/v)プロテアーゼインヒビターカクテル、0.3%(v/v) IGEPAL CA630で溶出した。

【０１３６】

NiNTAカラムから得られたシトクロムP450 を速やかに、HiPrep 26/10 脱塩カラム(Pharmacia)を用いて、流速5ml/分で、10 mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、2.0 mM DTT、1mM EDTA 中に脱塩した。

【０１３７】

脱塩されたシトクロムP450をそのまま、あらかじめ10 mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、2.0 mM DTT、1 mM EDTA で平衡化したCM Sepharose カラム(Pharmacia)にかけた。次の段階溶出が適用された：カラム容積の20倍容の 10mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、2.0mM DTT、1mM EDTAで洗浄し、界面活性剤を完全に除去するために75 mM KClを含む上記バッファーで洗浄し、その後、KCl濃度を500 mMに高めた上記バッファーで溶出した。

【０１３８】
タンパク質は、結晶化アッセイのために微量濃縮装置を用いて40 mg/mlまで濃縮した。
【０１３９】
2C19-1Bの結晶化
2C19-1Bの結晶は、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって成長させた。10mM Kpi pH 7.4、0.5 M KCl、2mM DTT、1mM EDTA、20% グリセロール中の40mg/mlのタンパク質を、0.5μlの液滴を用いて1:1の割合でリザーバー溶液と混合した。2C19-1Bの結晶は下記を含有するリザーバー溶液上で成長した：
0.1 M K2HPO4、25% PEG 3350
0.15 M K2HPO4、20% PEG 3350
0.15 M K2HPO4、25% PEG 3350
0.2 M K2HPO4、20% PEG 3350
0.2 M K2HPO4、25% PEG 3350
0.25 M K2HPO4、20% PEG 3350
0.25 M K2HPO4、25% PEG 3350
0.1 M Tris-HCl pH 8.4、0.1 M 硫酸リチウム、15% PEG 4000
0.05 M Tris-HCl pH 8.4、0.2 M硫酸リチウム、20% PEG 4000
0.05 M Tris-HCl pH 8.4、0.2 M硫酸リチウム、25% PEG 4000
0.1 M Tris-HCl pH 7、20% MPEG 2000
0.1 M HEPES pH 7.5、0.2 M 塩化ナトリウム、20% PEG 3000
0.1 M イミダゾール-HCl pH 8、10% イソプロパノール
0.1 M Tris-HCl pH 7、20% エタノール
【０１４０】
結晶は25℃にて1日以内に形成され、針状、棒状、および六方晶の形態を有する。
【０１４１】
実施例3 － 2D6の精製および結晶化
2D6構築物の設計
ヒトシトクロムP450の異種発現は、適切に折り畳まれたタンパク質の低収率をもたらすことが多い。加えて、シトクロムP450は膜貫通ドメインおよび多くのフレキシブルループを含有する。これらの要因は、構造決定に十分なタンパク質の生産、またはタンパク質の結晶化能を妨げる可能性がある。低発現の理由の１つは、発現のために使用される大腸菌宿主に対するヒト遺伝子の異なったコードの偏りにあると考えられる。これが発現に何らかの影響を及ぼすかどうかを判定するために、ヒトシトクロムP450 2D6の、トランケートされHisタグを付した形のコドン最適化型を作製した。この構築物はまた、タンパク質の膜貫通ドメインを除去し、C末端Hisタグを導入し、変異型タンパク質の作製に使用するために適切に間隔をおいた制限酵素切断部位をDNAレベルで組み込むように設計された。
【０１４２】
ヒトシトクロムP450 2D6のタンパク質コード配列は、公開アクセスデータベース（SwissProt P10635）から得られた。
【０１４３】
その後、このタンパク質の膜貫通ドメインを除去し（残基1-33）、発現を助けるためにリーダー配列を付加し（makktsskgr）、そして1個のグリシン、1個のアラニンおよび4ヒスチジンタグを分子のC末端に付加した。グリシンおよびアラニンを付加して、タグを変えるために使用されるsacI制限酵素切断部位を組み込んだ。これが結果として望ましいタンパク質配列（配列番号6）をもたらした。
【０１４４】
このタンパク質配列を、次に、Lasergeneプログラムのパッケージソフトの一部であるEditSeqを用いて逆転写した。このプログラムは、大腸菌でもっとも高頻度に使用されるコドンで逆転写するオプションを含む。これは、逆転写されたDNA配列をもたらした。縮重型の配列も作製し（考えられるあらゆるコドンの使用を表す配列）、この配列を、発現に

使用されたpCWベクターには存在しない制限酵素切断部位（すなわち、インサートにユニークな部位）の存在についてスキャンした。その後、ユニークな制限酵素切断部位がコード配列の全体にわたって約100bp間隔で確実に付加されるようにするために遺伝子のコドン使用を変更した（コードされるタンパク質は変えないようにする）。このようにして、ユニークな制限酵素切断部位を分散配置することによってタンパク質のいかなる部位の除去／置換も容易に可能となることが期待された。これは、結果として遺伝子アセンブリによって生成される望ましい遺伝子配列（配列番号5）をもたらした。

【０１４５】

本発明で使用される2D6のDNA配列およびタンパク質配列を、配列番号5および6に示す。もう一つの態様において、本発明は、配列番号5の配列を有する核酸、好ましくはDNAを提供する。このDNAは2D6を発現させるための発現ベクターに含めることができる。発現ベクターは、細菌宿主細胞、特に大腸菌において2D6を発現させるために設計された細菌発現ベクターであることが好ましい。

【０１４６】

pCWベクター中の最適化2D6をコードするこのDNAで形質転換された、結果として得られた宿主細胞は、驚異的高レベルの発現（50～90 mg/l）を示し、これは構造研究のために特に有利である。

【０１４７】

上記実施例1でのタンパク質と同様に、P450のN-トランケーションは、MAKKTSSKGR（配列番号10）のN末端配列をもたらした。

【０１４８】

実験

構築物作製

ヒトシトクロムP450 2D6のタンパク質コード配列は、公開アクセスデータベース（SwissProt P10635）から得られた。そこでこのタンパク質の膜貫通ドメインを除去し（残基1-33）、発現を助けるためにリーダー配列を付加し（makktsskgr、配列番号10）、グリシン、アラニンおよび4ヒスチジンタグをいずれも１つ、分子のC末端に付加した（注記：グリシンおよびアラニンを付加することにより、タグを変えるために使用されるsacI制限酵素切断部位を組み込んだ）。この結果、望ましいタンパク質配列（配列番号6）がもたらされた。

【０１４９】

このタンパク質配列を、次に、Lasergeneプログラムのパッケージソフトの一部であるEditSeqを用いて逆転写した。このプログラムは、大腸菌でもっとも高頻度に使用されるコドンで逆転写するオプションを含む。これは、逆転写されたDNA配列をもたらした。縮重型の配列も作製し（考えられるあらゆるコドンの使用を示す配列）、この配列を、発現に使用されるpCWベクターには存在しない制限酵素切断部位（すなわち、インサートにユニークな部位）の存在についてスキャンした。その後、ユニークな制限酵素切断部位がコード配列の全体にわたって約100bp間隔で確実に付加されるようにするために遺伝子のコドン使用を変更した（コードされるタンパク質は変えないようにする）。このようにして、ユニークな制限酵素切断部位を分散配置することによってタンパク質のいかなる部位の除去／置換も容易に可能となることが期待された。これは、結果として望ましい遺伝子配列（配列番号5）をもたらした。

【０１５０】

上記のコドン最適化2D6配列に対する配列を、両方のDNA鎖とも50bpのオリゴに分割した。これらのオリゴは反対側の鎖に由来するオリゴと25bpだけ重なり合うように設計した。

【０１５１】

2D6アセンブリのために用いたオリゴ(すべてのオリゴ(配列番号16～71)を5’-3’で示す)

2D6ass5'1　　CATATGGCTAAAAAAACCTCTTCTAAAGGCCGACCGCCGGGTCCGCTGCC

2D6ass5'2　　GCTGCCAGGCCTGGGTAACCTGCTGCATGTGGACTTCCAGAACACCCCGT

2D6ass5'3 ACTGCTTCGACCAGCTGCGTCGTCGTTTCGGTGACGTGTTCTCTCTGCAG
2D6ass5'4 CTGGCTTGGACCCCGGTTGTTGTTCTGAACGGTCTGGCTGCTGTTCGCGA
2D6ass5'5 AGCTCTGGTTACCCACGGTGAAGACACCGCTGACCGTCCGCCGGTCCCGA
2D6ass5'6 TCACCCAGATCCTGGGTTTTGGTCCGCGTTCCCAAGGTGTTTTCCTGGCT
2D6ass5'7 CGTTACGGACCGGCTTGGCGTGAACAGCGTCGTTTCTCTGTTTCTACCCT
2D6ass5'8 GCGTAACCTGGGTCTGGGTAAAAAATCTCTGGAACAGTGGGTTACCGAAG
2D6ass5'9 AAGCTGCATGCCTGTGCGCTGCTTTCGCTAACCACTCTGGTCGTCCGTTC
2D6ass5'10 CGTCCGAACGGTCTGCTGGACAAAGCTGTTTCTAACGTTATCGCTTCTCT
2D6ass5'11 GACCTGCGGCCGCCGTTTCGAATACGACGACCCGCGTTTCCTGCGTCTGC
2D6ass5'12 GGACCTGGCTCAGGAAGGTCTGAAAGAGGAGTCTGGTTTCCTGCGTGAA 10
2D6ass5'13 GTTCTGAACGCTGTTCCGGTTCTGCTGCACATCCCAGCTCTGGCTGGTAA
2D6ass5'14 AGTTCTGCGTTTCCAGAAAGCATTCCTGACCCAGCTGGACGAACTGCTGA
2D6ass5'15 CCGAACACCGTATGACCTGGGACCCGGCTCAGCCGCCACGTGACCTGACC
2D6ass5'16 GAAGCTTTCCTGGCTGAAATGGAAAAAGCTAAAGGTAACCCGGAATCTTC
2D6ass5'17 TTTCAACGATGAAAATCTGCGTATCGTTGTTGCTGACCTGTTCTCCGCGG
2D6ass5'18 GTATGGTTACCACCTCTACCACCCTGGCTTGGGGTCTGCTGCTGATGATC
2D6ass5'19 CTGCACCCGGATGTACAGCGTCGTGTTCAGCAGGAAATCGACGACGTTAT
2D6ass5'20 TGGCCAGGTTCGTCGGCCGGAAATGGGTGACCAGGCTCACATGCCGTACA
2D6ass5'21 CCACCGCTGTTATCCACGAAGTTCAGCGCTTCGGTGACATCGTTCCGCTG
2D6ass5'22 GGTATGACCCACATGACCTCTCGTGACATCGAAGTTCAGGGTTTCCGTAT 20
2D6ass5'23 CCCGAAAGGTACCACCCTGATCACCAACCTGTCTTCTGTTCTGAAAGACG
2D6ass5'24 AAGCTGTTTGGGAAAAACCGTTCCGTTTCCATCCGGAACACTTCCTGGAC
2D6ass5'25 GCTCAGGGTCACTTCGTTAAACCGGAAGCTTTCCTGCCGTTCTCTGCTGG
2D6ass5'26 TCGTCGTGCTTGCCTGGGTGAACCGCTGGCTCGTATGGAACTGTTCCTGT
2D6ass5'27 TCTTCACCTCTCTGCTGCAGCACTTCTCTTTCTCTGTTCCGACCGGTCAG
2D6ass5'28 CCGCGTCCGTCTCACCACGGTGTTTTCGCTTTCCTGGTTTCTCCGTCTCC
2D6ass3'1
GTCGACTCAGTGGTGGTGGTGAGCTCCACGCGGAACAGCGCACAGTTCGTACGGAGACGGAGAAACCAGG
AAAGCGA
2D6ass3'2 AAACACCGTGGTGAGACGGACGCGGCTGACCGGTCGGAACAGAGAAAGAG 30
2D6ass3'3 AAGTGCTGCAGCAGAGAGGTGAAGAACAGGAACAGTTCCATACGAGCCAG
2D6ass3'4 CGGTTCACCCAGGCAAGCACGACGACCAGCAGAGAACGGCAGGAAAGCTT
2D6ass3'5 CCGGTTTAACGAAGTGACCCTGAGCGTCCAGGAAGTGTTCCGGATGGAAA
2D6ass3'6 CGGAACGGTTTTTCCCAAACAGCTTCGTCTTTCAGAACAGAAGACAGGTT
2D6ass3'7 GGTGATCAGGGTGGTACCTTTCGGGATACGGAAACCCTGAACTTCGATGT
2D6ass3'8 CACGAGAGGTCATGTGGGTCATACCCAGCGGAACGATGTCACCGAAGCGC
2D6ass3'9 TGAACTTCGTGGATAACAGCGGTGGTGTACGGCATGTGAGCCTGGTCACC
2D6ass3'10 CATTTCCGGCCGACGAACCTGGCCAATAACGTCGTCGATTTCCTGCTGAA
2D6ass3'11 CACGACGCTGTACATCCGGGTGCAGGATCATCAGCAGCAGACCCCAAGCC
2D6ass3'12 AGGGTGGTAGAGGTGGTAACCATACCCGCGGAGAACAGGTCAGCAACAAC 40
2D6ass3'13 GATACGCAGATTTTCATCGTTGAAAGAAGATTCCGGGTTACCTTTAGCTT
2D6ass3'14 TTTCCATTTCAGCCAGGAAAGCTTCGGTCAGGTCACGTGGCGGCTGAGCC
2D6ass3'15 GGGTCCCAGGTCATACGGTGTTCGGTCAGCAGTTCGTCCAGCTGGGTCAG
2D6ass3'16 GAATGCTTTCTGGAAACGCAGAACTTTACCAGCCAGAGCTGGGATGTGCA
2D6ass3'17 GCAGAACCGGAACAGCGTTCAGAACTTCACGCAGGAAACCAGACTCCTCT
2D6ass3'18 TTCAGACCTTCCTGAGCCAGGTCCAGCAGACGCAGGAAACGCGGGTCGTC
2D6ass3'19 GTATTCGAAACGGCGGCCGCAGGTCAGAGAAGCGATAACGTTAGAAACAG
2D6ass3'20 CTTTGTCCAGCAGACCGTTCGGACGGAACGGACGACCAGAGTGGTTAGCG
2D6ass3'21 AAAGCAGCGCACAGGCATGCAGCTTCTTCGGTAACCCACTGTTCCAGAGA
2D6ass3'22 TTTTTTACCCAGACCCAGGTTACGCAGGGTAGAAACAGAGAAACGACGCT 50

2D6ass3'23 GTTCACGCCAAGCCGGTCCGTAACGAGCCAGGAAAACACCTTGGGAACGC
2D6ass3'24 GGACCAAAACCCAGGATCTGGGTGATCGGGACCGGCGGACGGTCAGCGGT
2D6ass3'25 GTCTTCACCGTGGGTAACCAGAGCTTCGCGAACAGCAGCCAGACCGTTCA
2D6ass3'26 GAACAACAACCGGGGTCCAAGCCAGCTGCAGAGAGAACACGTCACCGAAA
2D6ass3'27 CGACGACGCAGCTGGTCGAAGCAGTACGGGGTGTTCTGGAAGTCCACATG
2D6ass3'28 CAGCAGGTTACCCAGGCCTGGCAGCGGCAGCGGACCCGGCGGTCGGCCTT

【０１５２】

PCRによって持ち込まれるエラーを最小限にするように、遺伝子を4つの部分でアセンブルした。使用したオリゴは、2D6ass5’1-7および2D6ass3’22-28、2D6ass5’6-15と2D6ass3’12-22、2D6ass5’15-21と2D6ass3’8-14、ならびに2D6ass5’20-28と2D6ass3’1-9であった。

【０１５３】

オリゴを100pM/μlとなるように滅菌水に再懸濁し、各オリゴの5μlをエッペンドルフに入れた。次に、この混合物をさまざまの量（1、2、4μl）で下記のPCRサイクルに供し、

ステップ1 40℃にて2分
ステップ2 72℃にて10秒
ステップ3 94℃にて15秒
ステップ4 40℃にて30秒
ステップ5 72℃にて20秒＋サイクル当たり2秒
ステップ6 4℃に保持
ステップ3～5を39回繰り返した。

【０１５４】

その後、4つの遺伝子断片を、全長産物を富化するための回収PCRにおいて、各アセンブリの末端プライマーを使用することによって回収した。これらの反応は下記のサイクルパラメーターにしたがい、

ステップ1 95℃にて2分
ステップ2 95℃にて30秒
ステップ3 57/60℃にて30秒
ステップ4 72℃にて1分
ステップ5 72℃にて10分
ステップ6 4℃に保持
ステップ2～4を25回繰り返した。

【０１５５】

その後、これらの遺伝子断片を、そのDNA末端にAオーバーハングを付加するために、Taqポリメラーゼとともに72℃にて10分間インキュベートした。この方法によって、断片のベクターpCR4(Invitrogen)へのTOPOクローニングが可能となった。

【０１５６】

次に、TOPOクローニングされた断片を、それらが正しいことを確認するためにDNA配列決定に供した。4つの遺伝子構築断片のうち3つは正しい配列を有したが、1つはフレームシフト突然変異を含んでいた。部分遺伝子2D6ass5’15-21および2D6ass5’20-28を含有するpCR4クローンを制限酵素AfeIおよびNcoI(NEB)で消化した。その後2D6ass5’15-21 AfeI NcoI断片を2D6ass5’20-28ベクター内に連結して、オリゴ2D6ass5’15-28にわたる遺伝子部分を含有するpCR4クローンを作製した。

【０１５７】

5’6-15を含有する遺伝子部分を制限酵素BlpIおよびPciIによって消化して、同じ制限エンドヌクレアーゼで消化したpCR4クローン2D6ass5’15-28に挿入した。これによってオリゴ2D6ass5’6-28にわたる遺伝子断片が作製された。

【０１５８】

オリゴ2D6ass5’1-7にわたる遺伝子部分を含有するpCR4ベクターを制限エンドヌクレア

ーゼNdeIおよびRsrIIで消化し、オリゴ2D6ass5’15-28にわたる遺伝子部分を含有するpCR4クローンを制限エンドヌクレアーゼRsrIIおよびSalIで消化した。2D6配列を含有する2つのDNA断片を、次に、制限エンドヌクレアーゼNdeIおよびSalIで消化したpCWori+ベクターに3部分連結した。すべての連結反応は、Rapid Ligationキット (Roche)の取扱説明書にしたがって実施された。結果として得られた2D6コドン最適化配列は1つのフレームシフトエラーを含有し、これはその後、Quickchange突然変異誘発プロトコール（Stratagene）および以下に示すプライマーを用いて修正された。

（すべてのオリゴを5’-3’で示す）

2D6 RT+RS 5' GTAACCTGGGTCTGGGTAAAAAATCTCTG (配列番号72)

2D6 RT+RS 3' CAGAGATTTTTTACCCAGACCCAGGTTAC (配列番号73)

【０１５９】

修正された産物のアリコートを用いて大腸菌XL1 Blue株を形質転換し、アミノ末端トランケート型2D6をコードするプラスミドpCW-2D6を得た。

【０１６０】

2D6の細菌での発現

XL1 blue細胞の単一のアンピシリン耐性コロニーをTerrific Broth(TB)中で振盪しながらほとんど飽和状態となるまで37℃にて一晩増殖させ、新しいTB培地に接種するために使用した。細菌は2リットル容フラスコ内で185rpm、37℃にて1リットルの100μg/mlアンピシリン含有TB培地中でOD600nm = 0.5まで増殖した。1mMイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）とともにインキュベートする30分前にヘム前駆体δ-アミノレブリン酸（80 mg/l）を添加して、温度を25℃に下げた。25℃にて48～72時間撹拌しながら細菌培養を続行した。

【０１６１】

2D6タンパク質の精製

細胞を10000 gにて10分間遠心によりペレット化して500 mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、0.1%(v/v) プロテアーゼインヒビターカクテル(Calbiochem)、10 mM イミダゾール、40U/ml DNアーゼ1 および 5 mM $MgSO_4$を含有するバッファー中に再懸濁した。

【０１６２】

Constant Systems社の細胞破砕装置に10000 psiで2回通すことによって細胞を溶解した。その後、22000 gで4℃にて30分間遠心することによって細胞片を除去した。

【０１６３】

界面活性剤IGEPAL CA630 (Sigma) を、10%ストック溶液から、最終濃度0.15%(v/v)となるように細胞溶解液に1滴ずつ添加し、その溶解液を、あらかじめ洗浄した NiNTA 樹脂(Qiagen) とともに一晩4℃にて撹拌しながらインキュベートした。タンパク質の結合したNiNTA 樹脂を4℃にて2000 g で2分間遠心することによってペレットとした。樹脂の20倍容の500 mM KPi、pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、10 mM イミダゾール、プロテアーゼインヒビターカクテルの1:1000 希釈物、0.15%(v/v) IGEPAL CA630で樹脂を洗浄し、樹脂を4℃にて2000 xg で2分間遠心することによってペレット化した。次にその樹脂を10倍容の500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、20 mM イミダゾール、0.1%(v/v) プロテアーゼインヒビター、0.15% IGEPAL CA630 で洗浄し、上記のように遠心することによって樹脂を回収した。

【０１６４】

この樹脂を4℃にてカラムに充填し、シトクロムP450を500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、300 mM イミダゾール、0.1%(v/v) プロテアーゼインヒビターカクテル、0.15%(v/v) IGEPAL CA630で溶出した。

【０１６５】

NiNTAカラムから得られたシトクロムP450 を速やかに、HiPrep 26/10 脱塩カラム(Pharmacia)を用いて、流速5ml/分で、10 mM KPi, pH 8.0、20% グリセロール、2.0 mM DTT、1mM EDTA 中に脱塩した。

【０１６６】
脱塩されたシトクロムP450をそのまま、あらかじめ10 mM KPi, pH 8.0、20% グリセロール、2.0 mM DTT、1 mM EDTA で平衡化したCM Sepharose カラム(Pharmacia)にかけた。次の段階溶出を適用した：カラム容積の20倍容の 10mM KPi, pH 8.0、20% グリセロール、2.0mM DTT、1mM EDTAで洗浄し、界面活性剤を完全に除去するために75 mM KClを含む上記バッファーで洗浄し、その後、KCl濃度を500 mMに高めた上記バッファーで溶出した。
【０１６７】
タンパク質は、結晶化アッセイのために微量濃縮装置を用いて40 mg/mlまで濃縮した。
【０１６８】
タンパク質の特性決定
最終調製物の品質を下記によって評価した：
(a) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動
市販のゲル（Nugen）をメーカーの使用説明書にしたがって使用してSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、CBB染色を行った。ゲルのデジタル画像をスキャンすることによって評価される純度は、少なくとも95%であると推定された。
【０１６９】
(b) 質量分析法
Bruker “BioTOF” エレクトロスプレー飛行時間型装置を使用して質量分析を行った。サンプルを保存バッファーから直接メタノール／水／ギ酸（50:48:2 v/v/v）に1000倍希釈するか、あるいはC4カラムを用いた逆相HPLC分離に供した。2+および1+荷電状態を用いて、ボンベシンおよびアンジオテンシンIによって較正を実施した。データは200～2000m/zの範囲から得られ、引き続いてBruker社のX-massプログラムによって処理された。質量の精度は一般的に10000分の1未満であった。
【０１７０】
2D6の質量スペクトル: 53606.8 Da (測定値)
53604.0 Da (N末端メチオニンを除いた予測値)
【０１７１】
2D6の結晶化
2D6の結晶はハンギングドロップ蒸気拡散法によって成長させた。10mM Kpi pH 7.4、0.5 M KCl、2mM DTT、1mM EDTA、20% グリセロール中40mg/mlのタンパク質を、0.5μlの液滴を用いて1:1の割合でリザーバー溶液と混合した。2C6の結晶は下記を含有するリザーバー溶液上で成長した：
0.1～0.15 Mクエン酸三ナトリウム二水和物pH5.6、5～10%イソプロパノール（IPA）、5～15% PEG 4000、0～5% PEG 400。
【０１７２】
好ましい条件は下記の通りである：
0.15 Mクエン酸三ナトリウム二水和物pH5.6、5% 2-プロパノール、5% PEG 4000；
0.15 Mクエン酸三ナトリウム二水和物pH5.6、5% 2-プロパノール、10% PEG 4000；
0.15 Mクエン酸三ナトリウム二水和物pH5.6、10% イソプロパノール、5% PEG 4000；
0.15 Mクエン酸三ナトリウム二水和物pH5.6、10% イソプロパノール、7.5% PEG 4000；
0.1 Mクエン酸三ナトリウムpH5.6、10% IPA、10% PEG 4000；
0.15 Mクエン酸三ナトリウムpH5.6、10% IPA、10% PEG 4000；
0.15 Mクエン酸三ナトリウムpH5.6、10% IPA、15% PEG 4000；
0.15 Mクエン酸三ナトリウムpH5.6、10% IPA、7.5% PEG 4000；
0.15 Mクエン酸三ナトリウム二水和物pH5.6、10%イソプロパノール、7.5% PEG 4000、5% PEG 400；
さらに、
0.1 Mクエン酸三ナトリウム二水和物pH5.6、10%イソプロパノール、7.5% PEG 4000；
0.1 Mクエン酸三ナトリウム二水和物pH5.6、10%イソプロパノール、5% PEG 4000；
0.15 Mクエン酸三ナトリウム二水和物pH5.6、10% 2-プロパノール、7.5% PEG 8000；

0.15 Mクエン酸三ナトリウム二水和物pH5.6、10% 2-プロパノール、5% グリセロール、7.5% PEG 4000；
0.1 M HEPES pH 7.5、0.2 M 塩化マグネシウム、30% PEG 400；
0.1 M イミダゾールpH 8、0.2 M 酢酸カルシウム、10% PEG 8000；
0.1 M カコジル酸ナトリウムpH 6.5、0.2 M 酢酸マグネシウム、15% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール；
0.1 M Tris-HCl pH 8.5、0.2 M 酢酸ナトリウム、15% PEG 4000；
0.150 ビス-トリスプロパンpH 5.8、10% 2-プロパノール、7.5% PEG 4K；
0.15 M クエン酸三ナトリウム pH5.6、10% イソプロパノール、5% PEG 4000（10 mM 塩化ストロンチウム、10 mM 塩化イットリウム、10 mM 塩化マグネシウム、10 mM 塩化マンガン、3% エタノール、10 mM タウリン、3% d-スクロース、4% n-プロパノール、4% 1,3-ブタンジオールなどの添加剤を含む）。

【０１７３】

結晶は25℃にて1～７日以内に不規則な板状として形成された。

【０１７４】

結晶を液体窒素中で、80%リザーバー溶液、20%エチレングリコールを抗凍結剤として用いて、瞬間凍結した。

【０１７５】

実施例4 － 3A4の精製および結晶化

3A4について用いられるN末端トランケーションは、結果的にN末端配列がGillamら、Arch. Biochem. Biophys. Vol. 305, 123-131, 1993に記載されたMAYGTHSHGLFKK (配列番号11)となる、NF10 N末端トランケーションである。高塩濃度バッファー中でのタンパク質の精製を容易にするために4ヒスチジンタグが3’末端に挿入された。

【０１７６】

3A4のクローニング

M18907 (GI_181373)に相当する3A4をヒト肝臓ライブラリー（Origene Technologies, Inc.）からクローニングした。

【０１７７】

PCRはメーカーの推奨にしたがって実施した：

肝臓ライブラリー		2.0μl
10X PCR バッファー(-Mg^{2+})		2.5μl
10mM dNTP		0.5μl
10mM $MgSO_4$		2.5μl
水		11.0μl
プライマー1	(10 pmol/μl)	3.0μl
プライマー2	(10 pmol/μl)	3.0μl

【０１７８】

プライマー1は全長3A4 cDNAの5’末端に相補的である。プライマー2はこのcDNAの3’末端に相補的であって、3A4タンパク質のC末端に4-Hisタグを付加する。

【０１７９】

94℃に加熱し、0.5μl(1ユニット)のVentポリメラーゼを添加する。
下記の通り35サイクル：

94℃	30秒
65℃	60秒
72℃	60秒

72℃にて5分間を1サイクル。

【０１８０】

1μl（2.5ユニット）のTaqポリメラーゼを添加して72℃にて10分間インキュベートした後、生成物1μlをTOPOクローニング反応に使用した（ベクターpCR4TOPO）。このクローニング反応を用いて、大腸菌XL1-blueを形質転換し、精製プラスミドのNdeI/SalI制限消化

によって陽性クローンを同定した。陽性クローンを完全に配列決定し、NdeI/SalIインサートをpET20bにサブクローニングしてクローン1384を得た。このクローンを次のPCR反応のテンプレートとして使用した。

【０１８１】

3A4のN末端トランケーション

Gillamら、Arch. Biochem. Biophys. Vol. 305, 123-131, 1993に記載され、公開されたNF10 N末端トランケーションを生じる3A4のN末端トランケーション。

【０１８２】

テンプレート(1384)	～5ng
10X PCRバッファー(+Mg^{2+})	5.0μl
10mM dNTP	1.0μl
水	42.0μl
プライマー2 (100 pmol/μl)	0.5μl
プライマー3 (100 pmol/μl)	0.5μl
Ventポリメラーゼ(2U/μl)	0.5μl

下記を25サイクル：

94℃	30秒
65℃	60秒
72℃	60秒

72℃にて5分間を1サイクル。

【０１８３】

1μl（2.5ユニット）のTaqポリメラーゼを添加して72℃にて10分間インキュベートした後、生成物1μlをTOPOクローニング反応に使用した（ベクターpCR4TOPO）。このクローニング反応を用いて、大腸菌XL1-blueを形質転換し、精製プラスミドのNdeI/SalI制限消化によって陽性クローンを同定した。陽性クローンを完全に配列決定し、NdeI/SalIインサートをpCWori+にサブクローニングして、配列番号7に示すコード配列を有するクローンp3A4を得た。このクローンを配列番号8のタンパク質の発現のために使用した。

【０１８４】

プライマー1

5’-GGAATTCATATGGCTCTCATCCCAGACTTGGCC-3’ (配列番号74)

プライマー2

5’-TGCGGTCGACTCAATGGTGATGGTGGGCTCCACTTACGGTGCCATCC-3’ (配列番号75)

プライマー3

5’-TTAACATATGGCATATGGTACTCATTCACATGGTCTGTTTAAAAAACTGGGAATTCCAGGGCCCACACC-3’ (配列番号76)

【０１８５】

細菌での発現

XL1 blue細胞の単一のアンピシリン耐性コロニーをTerrific Broth(TB)中で振盪しながらほとんど飽和状態となるまで37℃にて一晩増殖させ、新しいTB培地に接種するために使用した。細菌は2リットル容フラスコ内で185rpm、37℃にて1リットルの100μg/mlアンピシリン含有TB液体培地中でOD600nm = 0.5まで増殖した。1mMイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）とともにインキュベートする30分前にヘム前駆体δ-アミノレブリン酸（80 mg/l）を添加して、温度を25℃に下げた。25℃にて48～72時間撹拌しながら細菌培養を続行した。

【０１８６】

タンパク質の精製

細胞を10000 gにて10分間遠心してペレット化させ、500 mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、0.1%(v/v) プロテアーゼインヒビターカクテル(Calbiochem)、10 mM イミダゾール、40U/ml DNアーゼ1 および 5 mM $MgSO_4$を含有するバ

ッファー中に再懸濁した。

【０１８７】

Constant Systems社の細胞破砕装置に10000 psiで2回通すことによって細胞を溶解した。その後、22000 gで4℃にて30分間遠心することによって細胞片を除去した。

【０１８８】

界面活性剤IGEPAL CA630 (Sigma) を、10%ストック溶液から、最終濃度0.3%(v/v)となるように細胞溶解液に1滴ずつ添加し、その溶解液を、あらかじめ洗浄した NiNTA 樹脂(Qiagen) とともに一晩4℃にて撹拌しながらインキュベートした。タンパク質の結合したNiNTA 樹脂を4℃にて2000 g で2分間遠心することによってペレット化した。樹脂の20倍容の500 mM KPi、pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、10 mM イミダゾール、プロテアーゼインヒビターカクテルの1:1000 希釈物、0.3%(v/v) IGEPAL CA630で樹脂を洗浄し、樹脂を4℃にて2000 xg で2分間遠心することによってペレット化した。次にその樹脂を10倍容の500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、20 mM イミダゾール、0.1%(v/v) プロテアーゼインヒビター、0.3% IGEPAL CA630 で洗浄し、上記のように遠心することによって樹脂を回収した。

【０１８９】

この樹脂を4℃にてカラムに充填し、シトクロムP450を500 mM KPi, pH7.4、20% グリセロール、10 mM メルカプトエタノール、300 mM イミダゾール、0.1%(v/v) プロテアーゼインヒビターカクテル、0.3%(v/v) IGEPAL CA630で溶出した。

【０１９０】

NiNTAカラムから得られたシトクロムP450 を速やかに、HiPrep 26/10 脱塩カラム(Pharmacia)を用いて、流速5ml/分で、10 mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、2.0 mM DTT、1mM EDTA 中に脱塩した。

【０１９１】

脱塩されたシトクロムP450をそのまま、あらかじめ10 mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、2.0 mM DTT、1 mM EDTA で平衡化したCM Sepharose カラム(Pharmacia)にかけた。次の段階溶出を適用した：カラム容積の20倍容の 10mM KPi, pH 7.4、20% グリセロール、2.0mM DTT、1mM EDTAで洗浄し、界面活性剤を完全に除去するために75 mM KClを含む上記バッファーで洗浄し、その後、KCl濃度を500 mMに高めた上記バッファーで溶出した。

【０１９２】

タンパク質は、結晶化アッセイのために微量濃縮装置を用いて40 mg/mlまで濃縮した。

【０１９３】

タンパク質の特性決定

最終調製物の品質を下記によって評価した：

(a) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

市販のゲル（Nugen）をメーカーの使用説明書にしたがって使用してSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、CBB染色を行った。ゲルのデジタル画像をスキャンすることによって評価される純度は、少なくとも95%であると推定された。

【０１９４】

(b) 質量分析法

Bruker “BioTOF” エレクトロスプレー飛行時間型装置を使用して質量分析を行った。サンプルを保存バッファーから直接メタノール／水／ギ酸（50:48:2 v/v/v）に1000倍希釈するか、あるいはC4カラムを用いた逆相HPLC分離に供した。2+および1+荷電状態を用いて、ボンベシンおよびアンジオテンシンIによって較正を実施した。データは200～2000m/zの範囲から得られ、引き続いてBruker社のX-massプログラムによって処理された。質量の精度は一般的に10000分の1未満であった。

3A4の質量スペクトル: 55281 Da (測定値)
55278 Da (N末端メチオニンを除いた予測値)

【０１９５】

3A4の結晶化

3A4の結晶はハンギングドロップ蒸気拡散法によって成長させた。10mM Kpi pH 7.4、0.5 M KCl、2mM DTT、1mM EDTA、20% グリセロール中40mg/mlのタンパク質を、0.5μlの液滴を用いて1:1の割合でリザーバー溶液と混合した。3A4の結晶は0.1 M HEPES pH 7.5、0.2 M 塩化ナトリウム、30% PEG 400を含有するリザーバー溶液上で成長した。

【０１９６】

他に選択できる条件を下記に挙げる：

0.1 M HEPES pH 7.5、0.2 M 塩化ナトリウム、30% PEG 400
0.05 M HEPES pH 7.5、0.2 M塩化ナトリウム、35% PEG 400
0.05 M HEPES pH 7.5、0.2 M塩化ナトリウム、30% PEG 400
0.15 M イミダゾール-HCl pH 8、10% 2-プロパノール
0.1 M 2-(N-シクロヘキシルアミノ)エタンスルホン酸(CHES) pH 9.5、30% PEG 400
0.15 M Hepes-Na pH 7.5、5% IPA, 10% PEG 4000
0.1 M リン酸塩-クエン酸塩 pH 4.2、1.6 M NaH_2PO_4/ 0.4M K_2HPO_4
0.1 M クエン酸塩 pH 5.5、0.2M塩化ナトリウム、1.0 M リン酸アンモニウム
0.2 M 塩化リチウム、20% PEG 3350
0.2 M 塩化カリウム、20% PEG 3350
0.2 M ギ酸ナトリウム、20% PEG 3350
0.2 M ギ酸カリウム、20% PEG 3350
0.2 M ギ酸アンモニウム、20% PEG 3350
0.2 M 酢酸リチウム、20% PEG 3350
0.2 M 塩化カリウム、20% PEG 3350
0.2 M ギ酸ナトリウム、20% PEG 3350
0.2 M 酢酸リチウム、20% PEG 3350
0.2 M 酢酸ナトリウム、20% PEG 3350
0.2 M 酢酸カリウム、20% PEG 3350
0.2 M 酢酸アンモニウム、20% PEG 3350
0 .1 M HEPES pH 7.5、0.2 M塩化ナトリウム、30% PEG 400
0.1 M HEPES pH 7.5、5% イソプロパノール、10% PEG 4000
200 mM 酢酸カリウム、25% PEG 3350
200 mM 酢酸カリウム、25% PEG 3350
300 mM 酢酸ナトリウム、25% PEG 3350
200 mM ギ酸ナトリウム、25% PEG 3350
0.300 M 酢酸リチウム、25.0% PEG 3350
0.100 M イミダゾール-HCl pH 8、10% 2-プロパノール
0.150 M イミダゾール-HCl pH 8、10% 2-プロパノール

結晶は25℃にて1～７日以内に形成され、その形態は棒状であった。

【０１９７】

結晶の格子の大きさは、およそa=77Å、b=99Å、c=129Å、β=90°であった。空間群はI222である。このように、本発明は、上記の空間群および単位格子サイズ（a、bおよびcの大きさは他と無関係に+/-5%だけ変動する）を有する3A4の結晶を与える。

【０１９８】

80%リザーバー溶液、20%エチレングリコールを凍結防止剤として使用して結晶を液体窒素中で瞬間凍結した。

【０１９９】

3A4の結晶はまた、0.15M HEPES pH7.5、5% IPA、10% PEG 4000を含有するリザーバー溶液上でも成長した。

【０２００】

単位格子C2、すなわちa=152Å、b=101Å、c=78Å、α=90°、β=120°、γ=90°を有する結晶が得られた。このように、本発明は上記の空間群および単位格子サイズ（a、bおよびcの大きさは他と無関係に+/-5%だけ変動する）を有する3A4の結晶を与える。

【図面の簡単な説明】

【０２０１】

【図１】2C9および2C19のN末端配列を、膜挿入N末端領域を除去する「トランケーション」とともに示す。本明細書で与えられる残基の番号は野生型配列を参照して付けられる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO:1

2C19 (internal deletion, and His tagged) coding sequence.

ATGGCTAAGAAAACGAGCTCTAAAGGGCGGCCGCCTGGCCCCACTCCTCTCCCAGTGATTGGAAATATCCTACAGATAGA
TATTAAGGATGTCAGCAAATCCTTAACCAATCTCTCAAAAATCTATGGCCCTGTGTTCACTCTGTATTTTGGCCTGGAAC
GCATGGTGGTGCTGCATGGATATGAAGTGGTGAAGGAAGCCCTGATTGATCTTGGAGAGGAGTTTTCTGGAAGAGGCCAT
TTCCCACTGGCTGAAAGAGCTAACAGAGGATTTGGAATCGTTTTCAGCAATGGAAAGAGATGGAAGGAGATCCGGCGTTT
CTCCCTCATGACGCTGCGGAATTTTGGGATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGACCGTGTTCAAGAGGAAGCCCACTGCCTTG
TGGAGGAGTTGAGAAAAACCAAGGCTTCACCCTGTGATCCCACTTTCATCCTGGGCTGTGCTCCCTGCAATGTGATCTGC
TCCATTATTTTCCAGAAACGTTTCGATTATAAAGATCAGCAATTTCTTAACTTGATGGAAAAATTGAATGAAAACATCAG
GATTGTAAGCACCCCCTGGATCCAGATATGCAATAATTTTCCCACTATCATTGATTATTTCCCGGGAACCCATAACAAAT
TACTTAAAAACCTTGCTTTTATGGAAAGTGATATTTTGGAGAAAGTAAAAGAACACCAAGAATCGATGGACATCAACAAC
CCTCGGGACTTTATTGATTGCTTCCTGATCAAAATGGAGAAGGAAAAGCAAAACCAACAGTCTGAATTCACTATTGAAAA
CTTGGTAATCACTGCAGCTGACTTACTTGGAGCTGGGACAGAGACAACAAGCACAACCCTGAGATATGCTCTCCTTCTCC
TGCTGAAGCACCCAGAGGTCACAGCTAAAGTCCAGGAAGAGATTGAACGTGTCGTTGGCAGAAACCGGAGCCCCTGCATG
CAGGACAGGGGCCACATGCCCTACACAGATGCTGTGGTGCACGAGGTCCAGAGATACATCGACCTCATCCCCACCAGCCT
GCCCCATGCAGTGACCTGTGACGTTAAATTCAGAAACTACCTCATTCCCAAGGGCACAACCATATTAACTTCCCTCACTT
CTGTGCTACATGACAACAAAGAATTTCCCAACCCAGAGATGTTTGACCCTCGTCACTTTCTGCATGAAGGTGGAAATTTT
AAGAAAAGTAACTACTTCATGCCTTTCTCAGCAGGAAAACGGATTTGTGTGGGAGAGGGCCTGGCCCGCATGGAGCTGTT
TTTATTCCTGACCTTCATTTTACAGAACTTTAACCTGAAATCTCTGATTGACCCAAAGGACCTTGACACAACTCCTGTTG
TCAATGGATTTGCTTCTGTCCGCCCTTCTACCAGCTCTGCTTCATTCCTGTCCACCACCACCACTGA

SEQ ID NO:2

Protein sequence of 2C19 coded by SEQ ID NO:1

MAKKTSSKGRPPGPTPLPVIGNILQIDIKDVSKSLTNLSKIYGPVFTLYFGLERMVVLHGYEVVKEALIDLGEEF
SGRGHFPLAERANRGFGIVFSNGKRWKEIRRFSLMTLRNFGMGKRSIEDRVQEEAHCLVEELRKTKASPCDPTFI
LGCAPCNVICSIIFQKRFDYKDQQFLNLMEKLNENIRIVSTPWIQICNNFPTIIDYFPGTHNKLLKNLAFMESDI
LEKVKEHQESMDINNPRDFIDCFLIKMEKEKQNQQSEFTIENLVITAADLLGAGTETTSTTLRYALLLLLKHPEV
TAKVQEEIERVVGRNRSPCMQDRGHMPYTDAVVHEVQRYIDLIPTSLPHAVTCDVKFRNYLIPKGTTILTSLTSV
LHDNKEFPNPEMFDPRHFLHEGGNFKKSNYFMPFSAGKRICVGEGLARMELFLFLTFILQNFNLKSLIDPKDLDT
TPVVNGFASVPPFYQLCFIPVHHHH

SEQ ID No:3
2C19 wild type 1B.

ATGGCTAAGAAAACGAGCTCTAAAGGGCGGCCGCCTGGCCCTACTCCTCTCCCAGTGATTGGAAATATCCTACAG
ATAGATATTAAGGATGTCAGCAAATCCTTAACCAATCTCTCAAAAATCTATGGCCCTGTGTTCACTCTGTATTTT
GGCCTGGAACGCATGGTGGTGCTGCATGGATATGAAGTGGTGAAGGAAGCCCTGATTGATCTTGGAGAGGAGTTT
TCTGGAAGAGGCCATTTCCCACTGGCTGAAAGAGCTAACAGAGGATTTGGAATCGTTTTCAGCAATGGAAAGAGA
TGGAAGGAGATCCGGCGTTTCTCCCTCATGACGCTGCGGAATTTTGGGATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGACCGT
GTTCAAGAGGAAGCCCGCTGCCTTGTGGAGGAGTTGAGAAAAACCAAAGCTTCACCCTGTGATCCCACTTTCATC
CTGGGCTGTGCTCCCTGCAATGTGATCTGCTCCATTATTTTCCAGAAACGTTTCGATTATAAAGATCAGCAATTT
CTTAACTTGATGGAAAAATTGAATGAAAACATCAGGATTGTAAGCACCCCCTGGATCCAGATATGCAATAATTTT
CCCACTATCATTGATTATTTCCCGGGAACCCATAACAAATTACTTAAAAACCTTGCTTTTATGGAAAGTGATATT
TTGGAGAAAGTAAAAGAACACCAAGAATCGATGGACATCAACAACCCTCGGGACTTTATTGATTGCTTCCTGATC
AAAATGGAGAAGGAAAAGCAAAACCAACAGTCTGAATTCACTATTGAAAACTTGGTAATCACTGCAGCTGACTTA
CTTGGAGCTGGGACAGAGACAACAAGCACAACCCTGAGATATGCTCTCCTTCTCCTGCTGAAGCACCCAGAGGTC
ACAGCTAAAGTCCAGGAAGAGATTGAACGTGTCGTTGGCAGAAACCGGAGCCCCTGCATGCAGGACAGGGGCCAC
ATGCCCTACACAGATGCTGTGGTGCACGAGGTCCAGAGATACATCGACCTCATCCCCACCAGCCTGCCCCATGCA
GTGACCTGTGACGTTAAATTCAGAAACTACCTCATTCCCAAGGGCACAACCATATTAACTTCCCTCACTTCTGTG
CTACATGACAACAAAGAATTTCCCAACCCAGAGATGTTTGACCCTCGTCACTTTCTGGATGAAGGTGGAAATTTT
AAGAAAAGTAACTACTTCATGCCTTTCTCAGCAGGAAAACGGATTTGTGTGGGAGAGGGCCTGGCCCGCATGGAG

CTGTTTTTATTCCTGACCTTCATTTTACAGAACTTTAACCTGAAATCTCTGATTGACCCAAAGGACCTTGACACA
ACTCCTGTTGTCAATGGATTTGCTTCTGTCCCGCCCTTCTACCAGCTCTGCTTCATTCCTGTCCACCACCACCAC
TGA

SEQ ID NO:4
Translation of SEQ ID NO:3

MAKKTSSKGRPPGPTPLPVIGNILQIDIKDVSKSLTNLSKIYGPVFTLYFGLERMVVLHGYEVVKEALIDLGEEF
SGRGHFPLAERANRGFGIVFSNGKRWKEIRRFSLMTLRNFGMGKRSIEDRVQEEARCLVEELRKTKASPCDPTFI
LGCAPCNVICSIIFQKRFDYKDQQFLNLMEKLNENIRIVSTPWIQICNNFPTIIDYFPGTHNKLLKNLAFMESDI
LEKVKEHQESMDINNPRDFIDCFLIKMEKEKQNQQSEFTIENLVITAADLLGAGTETTSTTLRYALLLLLKHPEV
TAKVQEEIERVVGRNRSPCMQDRGHMPYTDAVVHEVQRYIDLIPTSLPHAVTCDVKFRNYLIPKGTTILTSLTSV
LHDNKEFPNPEMFDPRHFLDEGGNFKKSNYFMPFSAGKRICVGEGLARMELFLFLTFILQNFNLKSLIDPKDLDT
TPVVNGFASVPPFYQLCFIPVHHHH

SEQ ID No:5
2D6 encoding nucleic acid

ATGGCTAAAAAAACCTCTTCTAAAGGCCGACCGCCGGGTCCGCTGCCGCTGCCAGGCCTGGGTAACCTGCTGCAT
GTGGACTTCCAGAACACCCCGTACTGCTTCGACCAGCTGCGTCGTCGTTTCGGTGACGTGTTCTCTCTGCAGCTG
GCTTGGACCCCGGTTGTTGTTCTGAACGGTCTGGCTGCTGTTCGCGAAGCTCTGGTTACCCACGGTGAAGACACC
GCTGACCGTCCGCCGGTCCCGATCACCCAGATCCTGGGTTTTGGTCCGCGTTCCCAAGGTGTTTTCCTGGCTCGT
TACGGACCGGCTTGGCGTGAACAGCGTCGTTTCTCTGTTTCTACCCTGCGTAACCTGGGTCTGGGTAAAAAATCT
CTGGAACAGTGGGTTACCGAAGAAGCTGCATGCCTGTGCGCTGCTTTCGCTAACCACTCTGGTCGTCCGTTCCGT
CCGAACGGTCTGCTGGACAAAGCTGTTTCTAACGTTATCGCTTCTCTGACCTGCGGCCGCCGTTTCGAATACGAC
GACCCGCGTTTCCTGCGTCTGCTGGACCTGGCTCAGGAAGGTCTGAAAGAGGAGTCTGGTTTCCTGCGTGAAGTT
CTGAACGCTGTTCCGGTTCTGCTGCACATCCCAGCTCTGGCTGGTAAAGTTCTGCGTTTCCAGAAAGCATTCCTG
ACCCAGCTGGACGAACTGCTGACCGAACACCGTATGACCTGGGACCCGGCTCAGCCGCCACGTGACCTGACCGAA
GCTTTCCTGGCTGAAATGGAAAAAGCTAAAGGTAACCCGGAATCTTCTTTCAACGATGAAAATCTGCGTATCGTT
GTTGCTGACCTGTTCTCCGCGGGTATGGTTACCACCTCTACCACCCTGGCTTGGGGTCTGCTGCTGATGATCCTG
CACCCGGATGTACAGCGTCGTGTTCAGCAGGAAATCGACGACGTTATTGGCCAGGTTCGTCGGCCGGAAATGGGT
GACCAGGCTCACATGCCGTACACCACCGCTGTTATCCACGAAGTTCAGCGCTTCGGTGACATCGTTCCGCTGGGT
ATGACCCACATGACCTCTCGTGACATCGAAGTTCAGGGTTTCCGTATCCCGAAAGGTACCACCCTGATCACCAAC
CTGTCTTCTGTTCTGAAAGACGAAGCTGTTTGGGAAAAACCGTTCCGTTTCCATCCGGAACACTTCCTGGACGCT
CAGGGTCACTTCGTTAAACCGGAAGCTTTCCTGCCGTTCTCTGCTGGTCGTCGTGCTTGCCTGGGTGAACCGCTG
GCTCGTATGGAACTGTTCCTGTTCTTCACCTCTCTGCTGCAGCACTTCTCTTTCTCTGTTCCGACCGGTCAGCCG
CGTCCGTCTCACCACGGTGTTTTCGCTTTCCTGGTTTCTCCGTCTCCGTACGAACTGTGCGCTGTTCCGCGTGGA
GCTCACCACCACCACTGA

SEQ ID NO 6:
Translation of SEQ ID NO:5

MAKKTSSKGRPPGPLPLPGLGNLLHVDFQNTPYCFDQLRRRFGDVFSLQLAWTPVVVLNGLAAVREALVTHGEDT
ADRPPVPITQILGFGPRSQGVFLARYGPAWREQRRFSVSTLRNLGLGKKSLEQWVTEEAACLCAAFANHSGRPFR
PNGLLDKAVSNVIASLTCGRRFEYDDPRFLRLLDLAQEGLKEESGFLREVLNAVPVLLHIPALAGKVLRFQKAFL
TQLDELLTEHRMTWDPAQPPRDLTEAFLAEMEKAKGNPESSFNDENLRIVVADLFSAGMVTTSTTLAWGLLLMIL
HPDVQRRVQQEIDDVIGQVRRPEMGDQAHMPYTTAVIHEVQRFGDIVPLGMTHMTSRDIEVQGFRIPKGTTLITN
LSSVLKDEAVWEKPFRFHPEHFLDAQGHFVKPEAFLPFSAGRRACLGEPLARMELFLFFTSLLQHFSFSVPTGQP
RPSHHGVFAFLVSPSPYELCAVPRGAHHHH

SEQ ID NO:7
3A4

ATGGCATACGGTACTCATTCACATGGTCTGTTTAAAAAACTGGGAATTCCAGGGCCCACACCTCTGCCTTTTTTG
GGAAATATTTTGTCCTACCATAAGGGCTTTTGTATGTTTGACATGGAATGTCATAAAAAGTATGGAAAAGTGTGG
GGCTTTTATGATGGTCAACAGCCTGTGCTGGCTATCACAGATCCTGACATGATCAAAACAGTGCTAGTGAAAGAA
TGTTATTCTGTCTTCACAAACCGGAGGCCTTTTGGTCCAGTGGGATTTATGAAAAGTGCCATCTCTATAGCTGAG
GATGAAGAATGGAAGAGATTACGATCATTGCTGTCTCCAACCTTCACCAGTGGAAAACTCAAGGAGATGGTCCCT
ATCATTGCCCAGTATGGAGATGTGTTGGTGAGAAATCTGAGGCGGGAAGCAGAGACAGGCAAGCCTGTCACCTTG

AAAGACGTCTTTGGGGCCTACAGCATGGATGTGATCACTAGCACATCATTTGGAGTGAACATCGACTCTCTCAAC
AATCCACAAGACCCCTTTGTGGAAAACACCAAGAAGCTTTTAAGATTTGATTTTTTGGATCCATTCTTTCTCTCA
ATAACAGTCTTTCCATTCCTCATCCCAATTCTTGAAGTATTAAATATCTGTGTGTTTCCAAGAGAAGTTACAAAT
TTTTTAAGAAAATCTGTAAAAAGGATGAAAGAAAGTCGCCTCGAAGATACACAAAAGCACCGAGTGGATTTCCTT
CAGCTGATGATTGACTCTCAGAATTCAAAAGAAACTGAGTCCCACAAAGCTCTGTCCGATCTGGAGCTCGTGGCC
CAATCAATTATCTTTATTTTTGCTGGCTATGAAACCACGAGCAGTGTTCTCTCCTTCATTATGTATGAACTGGCC
ACTCACCCTGATGTCCAGCAGAAACTGCAGGAGGAAATTGATGCAGTTTTACCCAATAAGGCACCACCCACCTAT
GATACTGTGCTACAGATGGAGTATCTTGACATGGTGGTGAATGAAACGCTCAGATTATTCCCAATTGCTATGAGA
CTTGAGAGGGTCTGCAAAAAAGATGTTGAGATCAATGGGATGTTCATTCCCAAAGGGGTGGTGGTGATGATTCCA
AGCTATGCTCTTCACCGTGACCCAAAGTACTGGACAGAGCCTGAGAAGTTCCTCCCTGAAAGATTCAGCAAGAAG
AACAAGGACAACATAGATCCTTACATATACACACCCTTTGGAAGTGGACCCAGAAACTGCATTGGCATGAGGTTT
GCTCTCATGAACATGAAACTTGCTCTAATCAGAGTCCTTCAGAACTTCTCCTTCAAACCTTGTAAAGAAACACAG
ATCCCCCTGAAATTAAGCTTAGGAGGACTTCTTCAACCAGAAAAACCCGTTGTTCTAAAGGTTGAGTCAAGGGAT
GGCACCGTAAGTGGAGCCCACCATCACCATTGA

SEQ ID NO:8
3A4

MAYGTHSHGLFKKLGIPGPTPLPFLGNILSYHKGFCMFDMECHKKYGKVWGFYDGQQPVLAITDPDMIKTVLVKE
CYSVFTNRRPFGPVGFMKSAISIAEDEEWKRLRSLLSPTFTSGKLKEMVPIIAQYGDVLVRNLRREAETGKPVTL
KDVFGAYSMDVITSTSFGVNIDSLNNPQDPFVENTKKLLRFDFLDPFFLSITVFPFLIPILEVLNICVFPREVTN
FLRKSVKRMKESRLEDTQKHRVDFLQLMIDSQNSKETESHKALSDLELVAQSIIFIFAGYETTSSVLSFIMYELA
THPDVQQKLQEEIDAVLPNKAPPTYDTVLQMEYLDMVVNETLRLFPIAMRLERVCKKDVEINGMFIPKGVVVMIP
SYALHRDPKYWTEPEKFLPERFSKKNKDNIDPYIYTPFGSGPRNCIGMRFALMNMKLALIRVLQNFSFKPCKETQ
IPLKLSLGGLLQPEKPVVLKVESRDGTVSGAHHHH

SEQ ID NO:9
AKKTSSKGR

SEQ ID NO:10
MAKKTSSKGR

SEQ ID NO:11
MAYGTHSHGLFKK

SEQ ID NO:12
5'CAAGAGGAAGCCCGCTGCCTTGTGGAGGAG3'

SEQ ID NO:13
5'CTCCTCCACAAGGCAGCGGGCTTCCTCTTG3'

SEQ ID NO:14
5'CCCTCGTCACTTTCTGGATGAAGGTGGAAATTTTAAG3'

SEQ ID NO:15
5'CTTAAAATTTCCACCTTCATCCAGAAAGTGACGAGGG3'

SEQ ID NOs:16-71:
2D6ass5'1 CATATGGCTAAAAAAACCTCTTCTAAAGGCCGACCGCCGGGTCCGCTGCC
2D6ass5'2 GCTGCCAGGCCTGGGTAACCTGCTGCATGTGGACTTCCAGAACACCCCGT
2D6ass5'3 ACTGCTTCGACCAGCTGCGTCGTCGTTTCGGTGACGTGTTCTCTCTGCAG

2D6ass5'4 CTGGCTTGGACCCCGGTTGTTGTTCTGAACGGTCTGGCTGCTGTTCGCGA
2D6ass5'5 AGCTCTGGTTACCCACGGTGAAGACACCGCTGACCGTCCGCCGGTCCCGA
2D6ass5'6 TCACCCAGATCCTGGGTTTTGGTCCGCGTTCCCAAGGTGTTTTCCTGGCT
2D6ass5'7 CGTTACGGACCGGCTTGGCGTGAACAGCGTCGTTTCTCTGTTTCTACCCT
2D6ass5'8 GCGTAACCTGGGTCTGGGTAAAAAATCTCTGGAACAGTGGGTTACCGAAG
2D6ass5'9 AAGCTGCATGCCTGTGCGCTGCTTTCGCTAACCACTCTGGTCGTCCGTTC
2D6ass5'10 CGTCCGAACGGTCTGCTGGACAAAGCTGTTTCTAACGTTATCGCTTCTCT
2D6ass5'11 GACCTGCGGCCGCCGTTTCGAATACGACGACCCGCGTTTCCTGCGTCTGC
2D6ass5'12 TGGACCTGGCTCAGGAAGGTCTGAAAGAGGAGTCTGGTTTCCTGCGTGAA
2D6ass5'13 GTTCTGAACGCTGTTCCGGTTCTGCTGCACATCCCAGCTCTGGCTGGTAA
2D6ass5'14 AGTTCTGCGTTTCCAGAAAGCATTCCTGACCCAGCTGGACGAACTGCTGA
2D6ass5'15 CCGAACACCGTATGACCTGGGACCCGGCTCAGCCGCCACGTGACCTGACC
2D6ass5'16 GAAGCTTTCCTGGCTGAAATGGAAAAAGCTAAAGGTAACCCGGAATCTTC
2D6ass5'17 TTTCAACGATGAAAATCTGCGTATCGTTGTTGCTGACCTGTTCTCCGCGG
2D6ass5'18 GTATGGTTACCACCTCTACCACCCTGGCTTGGGGTCTGCTGCTGATGATC
2D6ass5'19 CTGCACCCGGATGTACAGCGTCGTGTTCAGCAGGAAATCGACGACGTTAT
2D6ass5'20 TGGCCAGGTTCGTCGGCCGGAAATGGGTGACCAGGCTCACATGCCGTACA
2D6ass5'21 CCACCGCTGTTATCCACGAAGTTCAGCGCTTCGGTGACATCGTTCCGCTG
2D6ass5'22 GGTATGACCCACATGACCTCTCGTGACATCGAAGTTCAGGGTTTCCGTAT
2D6ass5'23 CCCGAAAGGTACCACCCTGATCACCAACCTGTCTTCTGTTCTGAAAGACG
2D6ass5'24 AAGCTGTTTGGGAAAAACCGTTCCGTTTCCATCCGGAACACTTCCTGGAC
2D6ass5'25 GCTCAGGGTCACTTCGTTAAACCGGAAGCTTTCCTGCCGTTCTCTGCTGG
2D6ass5'26 TCGTCGTGCTTGCCTGGGTGAACCGCTGGCTCGTATGGAACTGTTCCTGT
2D6ass5'27 TCTTCACCTCTCTGCTGCAGCACTTCTCTTTCTCTGTTCCGACCGGTCAG
2D6ass5'28 CCGCGTCCGTCTCACCACGGTGTTTTCGCTTTCCTGGTTTCTCCGTCTCC
2D6ass3'1
GTCGACTCAGTGGTGGTGGTGAGCTCCACGCGGAACAGCGCACAGTTCGTACGGAGACGGAGAAACCAG
GAAAGCGA
2D6ass3'2 AAACACCGTGGTGAGACGGACGCGGCTGACCGGTCGGAACAGAGAAAGAG
2D6ass3'3 AAGTGCTGCAGCAGAGAGGTGAAGAACAGGAACAGTTCCATACGAGCCAG
2D6ass3'4 CGGTTCACCCAGGCAAGCACGACGACCAGCAGAGAACGGCAGGAAAGCTT
2D6ass3'5 CCGGTTTAACGAAGTGACCCTGAGCGTCCAGGAAGTGTTCCGGATGGAAA
2D6ass3'6 CGGAACGGTTTTTCCCAAACAGCTTCGTCTTTCAGAACAGAAGACAGGTT
2D6ass3'7 GGTGATCAGGGTGGTACCTTTCGGGATACGGAAACCCTGAACTTCGATGT
2D6ass3'8 CACGAGAGGTCATGTGGGTCATACCCAGCGGAACGATGTCACCGAAGCGC
2D6ass3'9 TGAACTTCGTGGATAACAGCGGTGGTGTACGGCATGTGAGCCTGGTCACC
2D6ass3'10 CATTTCCGGCCGACGAACCTGGCCAATAACGTCGTCGATTTCCTGCTGAA
2D6ass3'11 CACGACGCTGTACATCCGGGTGCAGGATCATCAGCAGCAGACCCCAAGCC
2D6ass3'12 AGGGTGGTAGAGGTGGTAACCATACCCGCGGAGAACAGGTCAGCAACAAC
2D6ass3'13 GATACGCAGATTTTCATCGTTGAAAGAAGATTCCGGGTTACCTTTAGCTT
2D6ass3'14 TTTCCATTTCAGCCAGGAAAGCTTCGGTCAGGTCACGTGGCGGCTGAGCC
2D6ass3'15 GGGTCCCAGGTCATACGGTGTTCGGTCAGCAGTTCGTCCAGCTGGGTCAG
2D6ass3'16 GAATGCTTTCTGGAAACGCAGAACTTTACCAGCCAGAGCTGGGATGTGCA
2D6ass3'17 GCAGAACCGGAACAGCGTTCAGAACTTCACGCAGGAAACCAGACTCCTCT
2D6ass3'18 TTCAGACCTTCCTGAGCCAGGTCCAGCAGACGCAGGAAACGCGGGTCGTC
2D6ass3'19 GTATTCGAAACGGCGGCCGCAGGTCAGAGAAGCGATAACGTTAGAAACAG
2D6ass3'20 CTTTGTCCAGCAGACCGTTCGGACGGAACGGACGACCAGAGTGGTTAGCG
2D6ass3'21 AAAGCAGCGCACAGGCATGCAGCTTCTTCGGTAACCCACTGTTCCAGAGA
2D6ass3'22 TTTTTTACCCAGACCCAGGTTACGCAGGGTAGAAACAGAGAAACGACGCT
2D6ass3'23 GTTCACGCCAAGCCGGTCCGTAACGAGCCAGGAAAACACCTTGGGAACGC
2D6ass3'24 GGACCAAAACCCAGGATCTGGGTGATCGGGACCGGCGGACGGTCAGCGGT
2D6ass3'25 GTCTTCACCGTGGGTAACCAGAGCTTCGCGAACAGCAGCCAGACCGTTCA
2D6ass3'26 GAACAACAACCGGGGTCCAAGCCAGCTGCAGAGAGAACACGTCACCGAAA
2D6ass3'27 CGACGACGCAGCTGGTCGAAGCAGTACGGGGTGTTCTGGAAGTCCACATG
2D6ass3'28 CAGCAGGTTACCCAGGCCTGGCAGCGGCAGCGGACCCGGCGGTCGGCCTT

SEQ ID NO:72
GTAACCTGGGTCTGGGTAAAAAATCTCTG

SEQ ID NO:73
CAGAGATTTTTTACCCAGACCCAGGTTAC

SEQ ID NO:74
5′-GGAATTCATATGGCTCTCATCCCAGACTTGGCC-3′

SEQ ID NO:75
5′-TGCGGTCGACTCAATGGTGATGGTGGGCTCCACTTACGGTGCCATCC-3′

SEQ ID NO:76
5′-TTAACATATGGCATATGGTACTCATTCACATGGTCTGTTTAAAAAACT
GGGAATTCCAGGGCCCACACC-3′

SEQ ID NO:77
2C9-FGloop

MAKKTSSKGRPPGPTPLPVIGNILQIGIKDISKSLTNLSKVYGPVFTLYFGLKPIVVLHGYEAVKEALIDLGEEF
SGRGIFPLAERANRGFGIVFSNGKKWKEIRRFSLMTLRNFGMGKRSIEDRVQEEARCLVEELRKTKASPCDPTFI
LGCAPCNVICSIIFHKRFDYKDQQFLNLMEKLNENIKILSSPWIQVYNNFPALLDYFPGTHNKLLKNVAFMKSYI
LEKVKEHQESMDMNNPQDFIDCFLMKMEKEKHNQPSEFTIESLENTAVDLFGAGTETTSTTLRYALLLLLKHPEV
TAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRSHMPYTDAVVHEVQRYIDLLPTSLPHAVTCDIKFRNYLIPKGTTILISLTSV
LHDNKEFPNPEMFDPHHFLDEGGNFKKSKYFMPFSAGKRICVGEALAGMELFLFLTSILQNFNLKSLVDPKNLDT
TPVVNGFASVPPFYQLCFIPVHHHH

SEQ ID NO:78
2C9-P220 V60C

MAKKTSSKGRPPGPTPLPVIGNILQIGIKDISKSLTNLSKCYGPVFTLYFGLKPIVVLHGYEAVKEALIDLGEEF
SGRGIFPLAERANRGFGIVFSNGKKWKEIRRFSLMTLRNFGMGKRSIEDRVQEEARCLVEELRKTKASPCDPTFI
LGCAPCNVICSIIFHKRFDYKDQQFLNLMEKLNENIKILSSPWIQICNNFPTIIDYFPGTHNKLLKNVAFMKSYI
LEKVKEHQESMDMNNPQDFIDCFLMKMEKEKHNQPSEFTIESLENTAVDLFGAGTETTSTTLRYALLLLLKHPEV
TAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRSHMPYTDAVVHEVQRYIDLLPTSLPHAVTCDIKFRNYLIPKGTTILISLTSV
LHDNKEFPNPEMFDPHHFLDEGGNFKKSKYFMPFSAGKRICVGEALAGMELFLFLTSILQNFNLKSLVDPKNLDT
TPVVNGFASVPPFYQLCFIPVHHHH

SEQ ID NO:79
2C9-P220

MAKKTSSKGRPPGPTPLPVIGNILQIGIKDISKSLTNLSKVYGPVFTLYFGLKPIVVLHGYEAVKEALIDLGEEF
SGRGIFPLAERANRGFGIVFSNGKKWKEIRRFSLMTLRNFGMGKRSIEDRVQEEARCLVEELRKTKASPCDPTFI
LGCAPCNVICSIIFHKRFDYKDQQFLNLMEKLNENIKILSSPWIQICNNFPTIIDYFPGTHNKLLKNVAFMKSYI
LEKVKEHQESMDMNNPQDFIDCFLMKMEKEKHNQPSEFTIESLENTAVDLFGAGTETTSTTLRYALLLLLKHPEV
TAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRSHMPYTDAVVHEVQRYIDLLPTSLPHAVTCDIKFRNYLIPKGTTILISLTSV
LHDNKEFPNPEMFDPHHFLDEGGNFKKSKYFMPFSAGKRICVGEALAGMELFLFLTSILQNFNLKSLVDPKNLDT
TPVVNGFASVPPFYQLCFIPVHHHH

SEQ ID NO:80
2C9-FG Loop-K206E

MAKKTSSKGRPPGPTPLPVIGNILQIGIKDISKSLTNLSKVYGPVFTLYFGLKPIVVLHG
YEAVKEALIDLGEEFSGRGIFPLAERANRGFGIVFSNGKKWKEIRRFSLMTLRNFGMGKR
SIEDRVQEEARCLVEELRKTKASPCDPTFILGCAPCNVICSIIFHKRFDYKDQQFLNLME
KLNENIEILSSPWIQVYNNFPALLDYFPGTHNKLLKNVAFMKSYILEKVKEHQESMDMNN

PQDFIDCFLMKMEKEKHNQPSEFTIESLENTAVDLFGAGTETTSTTLRYALLLLLKHPEV
TAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRSHMPYTDAVVHEVQRYIDLLPTSLPHAVTCDIKFRNY
LIPKGTTILISLTSVLHDNKEFPNPEMFDPHHFLDEGGNFKKSKYFMPFSAGKRICVGEA
LAGMELFLFLTSILQNFNLKSLVDPKNLDTTPVVNGFASVPPFYQLCFIPVHHHH

SEQ ID NO:81
2C9 wild type P450

MDSLVVLVLCLSCLLLLSLWRQSSGRGKLPPGPTPLPVIGNILQIGIKDISKSLTNLSKVYGPVFTLYFGLKPIV
VLHGYEAVKEALIDLGEEFSGRGIFPLAERANRGFGIVFSNGKKWKEIRRFSLMTLRNFGMGKRSIEDRVQEEAR
CLVEELRKTKASPCDPTFILGCAPCNVICSIIFHKRFDYKDQQFLNLMEKLNENIKILSSPWIQICNNFSPIIDY
FPGTHNKLLKNVAFMKSYILEKVKEHQESMDMNNPQDFIDCFLMKMEKEKHNQPSEFTIESLENTAVDLFGAGTE
TTSTTLRYALLLLLKHPEVTAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRSHMPYTDAVVHEVQRYIDLLPTSLPHAVTCDIK
FRNYLIPKGTTILISLTSVLHDNKEFPNPEMFDPHHFLDEGGNFKKSKYFMPFSAGKRICVGEALAGMELFLFLT
SILQNFNLKSLVDPKNLDTTPVVNGFASVPPFYQLCFIPVHHHH

【図１】

```
                1         10         20         30         40
2C9野生型       MDSLVVLVLCLSCLLLLSLWRQSSGRGKLPPGPTPLPVIG

2c9             MA-------------------KKTSSKGRPPGPTPLPVIG
トランケート型

2C19野生型      MDPFVVLVLCLSCLLLLSIWRQSSGRGKLPPGPTPLPVIG

2C19            MA-------------------KKTSSKGRPPGPTPLPVIG
トランケート型
```

【手続補正書】
【提出日】平成16年6月7日(2004.6.7)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
シトクロムP450を精製する方法であって、以下のステップ：
(a) 宿主細胞培養物においてシトクロムP450分子を発現させること；
(b) 前記培養物から前記細胞を回収し、12～110 mS/cmの電気伝導度を有する塩バッファーに前記細胞を懸濁すること；
(c) 前記細胞を溶解し、細胞片を除去して高塩濃度溶解液を得ること；
(d) 前記溶解液に界面活性剤を添加して高塩濃度-界面活性剤溶解液を得ること；および
(e) 前記溶解液から前記P450を回収すること；
を含んでなるが、ただし、前記塩バッファーが200～1000mMの濃度を有する場合、P450は220位がプロリンで置換されたヒト2C9 P450ではない、前記方法。
【請求項２】
前記塩バッファーが200～1000mMの塩濃度を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
界面活性剤が0.015～1.2%v/vの濃度で添加される、請求項1または２に記載の方法。
【請求項４】
ステップ(e)が、
(e(i)) 前記P450をアフィニティ担体に結合させること；
(e(ii)) 前記担体を高塩濃度-界面活性剤洗浄液中で洗浄すること；
(e(iii)) 高塩濃度-界面活性剤バッファー中に前記P450を取り出し、P450-高塩濃度-界面活性剤調製物を得ること；および
(f) 前記調製物を迅速に脱塩してP450-低塩濃度調製物を取得すること；
によって実施される、請求項１～３のうちいずれか１つに記載の方法。
【請求項５】
ステップ(f)が、サイズ排除クロマトグラフィーにより前記調製物から塩を除去することによって行われる、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
P450がポリヒスチジンタグを保有する、請求項１～５のいずれか１つに記載の方法。
【請求項７】
P450がCYP1、2、3または4ファミリーのメンバーである、請求項１～６のいずれか１つに記載の方法。
【請求項８】
P450がCYP2ファミリーのメンバーである、請求項7に記載の方法。
【請求項９】
P450が2C9または2C19である、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
P450がそのN末端の膜挿入要素に欠失を含んでなる、請求項１～９のいずれか１つに記載の方法。
【請求項１１】
前記P450のN末端配列が、N末端膜挿入要素の代わりに、配列MAKKTSSKGRまたはMAYGTHSHGLFKKを含んでなる、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記P450が配列番号2、4、6または8を有する、請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】
P450の結晶化をさらに含んでなる、請求項１～１２のいずれか１つに記載の方法。
【請求項１４】
2C9、2C19、2D6および3A4の群から選択されるヒトシトクロムP450の結晶。
【請求項１５】
前記P450が2C19であって、前記結晶が格子サイズa=158Å、b=158Å、c=212Å（a、bおよびcについて+/-5%）、α=90°、β=90°、γ=120°、および空間群P321を有する、請求項１４に記載の結晶。
【請求項１６】
前記P450が2D6である、請求項１４に記載の結晶。
【請求項１７】
前記P450が、空間群I222および単位格子サイズa=77Å、b=99Å、c=129Å（a、bおよびcについて+/-5%）、β=90°を有する；または空間群C2および単位格子サイズa=152Å、b=101Å、c=78Å（a、bおよびcについて+/-5%）、α=90°、β=120°、γ=90°を有する3A4である、請求項１４に記載の結晶。
【請求項１８】
請求項１３に記載の方法にしたがって結晶を調製すること、その結晶をx線回折に供すること、および得られた回折パターンを解析して前記P450の原子の3次元座標を決定することを含んでなる、シトクロムP450の結晶構造を決定する方法。
【請求項１９】
配列番号５の2D6のコード配列を有するシトクロムP450 2D6を発現させるための核酸。
【請求項２０】
請求項１９に記載の核酸を含んでなる細菌発現ベクター。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/02668

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/53 C12N9/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
BIOSIS, EPO-Internal, INSPEC, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WILLIAMS PAMELA A ET AL: "Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: Structural adaptations for membrane binding and functional diversity." MOLECULAR CELL., vol. 5, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 121-131, XP002222921 ISSN: 1097-2765 cited in the application	14
Y	abstract; figure 2; table 1	1-8
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [ ] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 January 2003	27/01/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Espen, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/02668

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VON WACHENFELDT CLAES ET AL: "Microsomal P450 2C3 is expressed as a soluble dimer in Escherichia coli following modifications of its N-terminus." ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 339, no. 1, 1997, pages 107-114, XP002222918 ISSN: 0003-9861 cited in the application page 109	1-8
Y	COSME JOSE ET AL: "Engineering microsomal cytochrome P450 2C5 to be a soluble, monomeric enzyme. Mutations that alter aggregation, phospholipid dependence of catalysis, and membrane binding." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 4, 28 January 2000 (2000-01-28), pages 2545-2553, XP002222919 ISSN: 0021-9258 cited in the application page 2546 -page 2547	1-8
X	HASEMANN C A ET AL: "CRYSTAL STRUCTURE AND REFINEMENT OF CYTOCHROME P450TERP AT 2.3 A RESOLUTION" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 236, no. 4, 1994, pages 1169-1185, XP001120740 ISSN: 0022-2836 cited in the application abstract	14
A	LEWIS DAVID F V: "Homology modelling of human cytochromes P450 involved in xenobiotic metabolism and rationalization of substrate selectivity." EXPERIMENTAL AND TOXICOLOGIC PATHOLOGY, vol. 51, no. 4-5, July 1999 (1999-07), pages 369-374, XP009003755 ISSN: 0940-2993	
A	IBEANU G C ET AL: "IDENTIFICATION OF RESIDUES 99, 220, AND 221 OF HUMAN CYTOCHROME P450 2C19 AS KEY DETERMINANTS OF OMEPRAZOLE HYDROXYLASE ACTIVITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 271, no. 21, 24 May 1996 (1996-05-24), pages 12496-12501, XP001017944 ISSN: 0021-9258	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/02668

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB 02/02668

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: in part: 1-11,13,14,18

   Purification and crystallizing of cytochrome P450 2C9 without its structure

2. Claims: 15; in part: 1-14, 18

   Purification and crystallizing of P450 2C19 and its structure

3. Claims: 16,19,20; in part: 1-8,10-14,18

   Purification and crystallizing of cytochrome P450 2D6 without its structure; nucleic acid for expression of said cytochrome

4. Claims: 17; in part: 1-8,10,11,12,13,14,18

   Purification and crystallizing of cytochrome P450 3A4 and its structure

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　1/19	Ｃ１２Ｎ　1/15	
Ｃ１２Ｎ　1/21	Ｃ１２Ｎ　1/19	
Ｃ１２Ｎ　5/10	Ｃ１２Ｎ　1/21	

(72)発明者　コスメ，ジョゼ
イギリス国　シービー４　０キューエイ　ケンブリッジ，ミルトン　ロード，ケンブリッジ　サイエンス　パーク　４３６，アステックス　テクノロジー　リミテッド
(72)発明者　ウォード，アリソン
イギリス国　シービー４　０キューエイ　ケンブリッジ，ミルトン　ロード，ケンブリッジ　サイエンス　パーク　４３６，アステックス　テクノロジー　リミテッド
(72)発明者　ブイヤード，ローラン
イギリス国　シービー４　０キューエイ　ケンブリッジ，ミルトン　ロード，ケンブリッジ　サイエンス　パーク　４３６，アステックス　テクノロジー　リミテッド
(72)発明者　ウィリアムズ，パメラ
イギリス国　シービー４　０キューエイ　ケンブリッジ，ミルトン　ロード，ケンブリッジ　サイエンス　パーク　４３６，アステックス　テクノロジー　リミテッド
(72)発明者　ハミルトン，ブルース
イギリス国　シービー４　０キューエイ　ケンブリッジ，ミルトン　ロード，ケンブリッジ　サイエンス　パーク　４３６，アステックス　テクノロジー　リミテッド

Ｆターム(参考)　2G001 AA01 BA18 CA01 GA01 KA08 KA12 LA01 MA04 NA19 RA02
4B024 AA01 AA11 BA08 CA04 DA06 EA04 GA11 HA03
4B050 CC04 DD11 FF01C FF02C FF03C FF12C FF14C FF17C LL01 LL03
4B065 AA26X AA93X AA93Y AB01 AC14 CA28 CA46
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA89 EA50 FA74 GA15 GA22
GA26